

ポリアミン代謝酵素阻害剤を用いる  
脂肪、肝臓及び筋肉細胞中の  
脂質蓄積調節に関する研究

石井 育美

## 目次

### 総論の部

緒言	1
第一章 脂肪細胞分化過程におけるポリアミン代謝変動	5
第一節 脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞分化過程におけるポリアミン代謝変動	6
第二節 3T3-L1 細胞分化過程におけるポリアミン合成酵素阻害剤の影響	7
(1) ポリアミン代謝酵素阻害剤を用いた 3T3-L1 細胞培養条件の検討	
(2) ポリアミン代謝酵素阻害剤添加による細胞内ポリアミン量への影響	
(a) MCHA 添加による細胞内ポリアミン量変動	
(b) APCHA 添加による細胞内ポリアミン量変動	
(c) ポリアミン合成酵素阻害剤のSSAT 活性に及ぼす影響	
第三節 脂肪細胞分化におけるポリアミン代謝酵素の影響	12
(1) ポリアミン代謝酵素活性変化と脂肪細胞分化の関連性の検討	
小括および考察	
第二章 成熟脂肪細胞の脂質蓄積におけるポリアミン代謝変動	14
第一節 成熟脂肪細胞の脂質蓄積におけるポリアミン合成酵素阻害剤の影響	16
(1) 成熟脂肪細胞の脂質蓄積における MCHA の影響	
(2) 成熟脂肪細胞の脂質蓄積における APCHA の影響	
第二節 脂質蓄積における SSAT 活性誘導剤の影響	18
小括および考察	

第三章 筋肉細胞および肝臓細胞の脂質蓄積におけるポリアミン代謝酵素阻害剤の 及ぼす影響	21
第一節 ヒト肝癌由来細胞 HepG2 細胞の脂質蓄積におけるポリアミン代謝変動	22
(1) HepG2 細胞を用いる脂質蓄積実験系の確立	
(2) 脂質蓄積誘導による HepG2 細胞内のポリアミン代謝変動	
(3) MCHA 及び APCHA 添加の脂質蓄積に及ぼす影響	
第二節 マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞の筋管細胞への分化過程における ポリアミン代謝変動	25
(1) C2C12 細胞の筋管細胞への分化条件の確立	
(2) 筋管細胞への分化過程におけるポリアミン代謝酵素活性変動	
(3) ポリアミン合成酵素阻害剤の筋管細胞分化に及ぼす影響	
(a) MCHA および APCHA 添加の分化に及ぼす影響	
(b) ポリアミン添加の分化に及ぼす影響	
第三節 C2C12 細胞の脂質蓄積におけるポリアミンの代謝変動	30
(1) C2C12 細胞における脂質蓄積誘導条件の検討	
(2) C2C12 細胞の脂質蓄積におけるポリアミン代謝酵素活性変動	
(3) ポリアミンの脂質蓄積に及ぼす影響	
(4) ポリアミン合成酵素阻害剤の脂質蓄積に及ぼす影響	
小括および考察	

第四章 SpmSyn 遺伝子欠損 Gy マウス組織中脂質量比較	36
第一節 Gy マウス肝臓中脂質量の解析	36
(1) Gy マウス肝臓中 TG 量	
(2) Gy マウス肝臓中 Cho 量	
(3) Gy マウス肝臓中 NEFA 量	
第二節 Gy マウス筋肉組織中脂質量の解析	38
小括および考察	
総括	41
略号	44
実験の部	46
引用文献	51
謝辞	54

## 総論の部

### 緒言

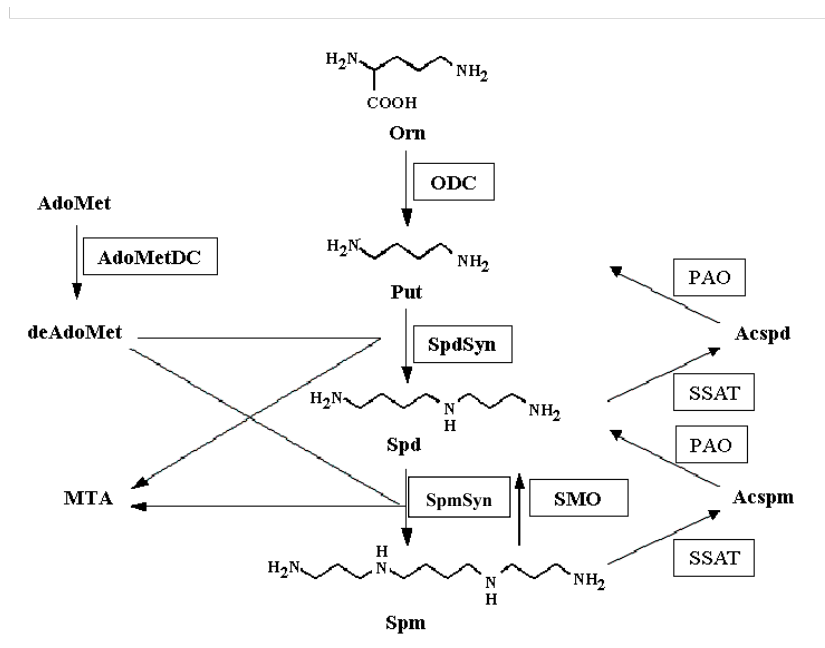
脂質代謝とは、エネルギー源としての脂肪酸、膜脂質としてのリン脂質とコレステロール、脂質由来のシグナル分子などの脂質分子の代謝である。これらの代謝は互いに連携しているが、そのなかで生活習慣病と関連深い肥満を生じる脂肪酸の貯蔵体であるトリグリセリド (TG) の蓄積は、食事からの摂取量と体内合成量に対する分解量の差し引きで決まる。TG は、余剰な脂肪酸や、余剰なグルコースから生合成される脂肪酸から合成される。血中グルコースと脂肪酸濃度が低下した低エネルギー状態では、蓄積された TG は分解系の亢進によって脂肪酸とグリセロールとなり、血中に放出され、各組織のエネルギー源となる。こうした恒常性は各組織が役割を分担し、厳密に調整されている。

脂肪組織は従来から知られている TG の貯蔵機能にくわえて、内分泌組織としての機能が報告され、注目を浴びている。脂肪細胞から分泌される生理活性物質はさまざま知られているが、肥大化した脂肪細胞からはレジスチン、Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、遊離脂肪酸 (FFA) などが多量に産生・分泌され、骨格筋、肝臓において脂質代謝異常を引き起こすことが明らかとなってきた [1]。また脂質代謝調節の中心的役割を担う転写因子として、Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) がある。PPAR- $\gamma$  の発現調節により脂肪細胞分化を促進し、小型脂肪細胞を増加させる一方で、肥大化した脂肪細胞をアポトーシスさせることによりインスリン抵抗性が抑制され、脂肪組織のみならず、骨格筋及び肝臓においてもエネルギー代謝が亢進するという報告があり [2]、脂肪細胞の肥大化抑制だけでなく、骨格筋、肝臓における脂質代謝異常を改善することが、肥満やメタボリックシンドロームの予防、改善に重要であると考えられる。

細胞内に最も多量に存在する生体アミンであるポリアミンの機能解明については、さまざまな視点からの研究が行われているが、脂質代謝に関与する報告として、肥満モデルラットである Zucker ラットの脂肪組織中において、脂肪合成に関与する酵素の活性上昇にくわえ、ポリアミン量が通常のラットの 3~4 倍にまで増加してい

ること [3]、さらにはラットから摘出した脂肪細胞へのポリアミン添加が、インスリン結合性を増強すること [4] などが知られている。

このような作用が示唆されるポリアミンとは、哺乳動物では主に、前駆体のプトレシン (Put) を含めたスペルミジン (Spd) やスペルミン (Spm) の 3 種を指す。哺乳動物におけるポリアミンの代謝では、Spd は Put からスペルミジン合成酵素 (SpdSyn) により合成され、Spm は Spd からスペルミン合成酵素 (SpmSyn) により合成される (Fig. 1)。また、生合成されたポリアミンは、スペルミジン/スペルミン *N*<sup>1</sup>-アセチル基転移酵素 (SSAT) と、ポリアミン酸化酵素 (PAO) により代謝される経路と、スペルミン酸化酵素 (SMO) により代謝される経路により分解される。細胞内のポリアミン量はこのような代謝経路により常に一定に保たれており、細胞の分化や増殖に伴いその量は厳密に調節されている [5]。ポリアミンは、タンパク質や核酸合成を促進する細胞増殖因子としての機能を有し、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体やヘパリンなどグルコサミノグリカンとの相互作用を介しての生体機能調節に関与しているが [6]、個々の作用については未だ不明な点が多い。しかし、これらポリアミン関連酵素の遺伝子実験により生体における作用がいくつか示唆されている。その例として、



**Fig. 1 Polyamine metabolic pathway**

Orn; Ornithine, ODC; Ornithine decarboxylase, Put; Putrescine, SpdSyn; Spermidine synthase, Spd; Spermidine, SpmSyn; Spermine synthase, Spm; Spermine, SSAT; Spermidine/spermine *N*<sup>1</sup>-acetyltransferase, PAO; Acetylpolyamine oxidase, SMO; Spermine oxidase, AcSpd; *N*<sup>1</sup>-Acetylspermidine, Acspm; *N*<sup>1</sup>-Acetylspermine, AdoMet; S-Adenosylmethionine, AdoMetDC; S-Adenosylmethionine decarboxylase, deAdoMet; Decarboxylated-S-Adenosylmethionine, MTA; 5'-Methylthioadenosine

ポリアミン代謝酵素の一つである SSAT 遺伝子発現の変化が、マウスの体脂肪率、肝臓内マロニル CoA 量に影響を与えることが報告されている。マロニル CoA は、細胞内 TG の生合成に必要であり、マロニル CoA の原料であるアセチル CoA は、SSAT の基質でもある。SSAT 遺伝子過剰発現マウスでは、ポリアミン異化作用が亢進しており、白色脂肪組織量の減少、基礎代謝率の上昇、耐糖能の改善、インスリン感受性の亢進がみられ、補酵素であるアセチル CoA の貯蔵量の約 90% が減少し、30 週齢において皮下脂肪量が通常と比べて減少する傾向を示す [7]。このような結果から、SSAT 遺伝子過剰発現による肝臓内マロニル CoA 量の減少、体脂肪率の減少は、アセチル CoA を SSAT の基質として多量に消費したことが原因であると考察されている。しかし、肝臓内ポリアミン量も変化していることから、体脂肪における影響だけでなく、肝臓内脂質蓄積にもポリアミンが影響している可能性も考えられる。

くる病モデルマウスである Gy マウスは、リン酸調節遺伝子と共に SpmSyn 遺伝子を欠損しており、Spm 量減少に起因すると思われる低体長、低体重、旋回運動、難聴、不妊、突然死など様々な異常を示す [8]。SpmSyn 遺伝子を導入した Gy マウスにはこれらの表現型は見られず、SpmSyn 遺伝子過剰発現マウスでは、Normal マウスに比べて体重が 20% 増加する [9]。また、ヒトでは伴性劣性遺伝の遺伝病であるシュナイダー・ロビンソン症候群において SpmSyn 遺伝子に一塩基変異があることが報告され、組織内 Spm 量が減少し、やせ、精神遅滞、小脳回路不全、骨粗鬆症、脊柱後弯症などの症状が見られる [10]。これらマウス、ヒトに共通して脂肪、脳、骨に異常が見られることから、SpmSyn がこれらの組織に何らかの作用を及ぼしていることが考えられる。

以上のことから、ポリアミンはその機序は未だ不明ながら、脂肪組織のみならず各組織の脂質代謝にも影響を与えている可能性が十分考えられる。なかでも SpmSyn 及び Spm 量の変化と脂質代謝の関与、とくに Spm 量の減少による脂肪量の減少、Spm 量の増加による脂肪量の増加が惹起されると推定される。そこで本研究では、これまで調べられていない脂質蓄積過程におけるポリアミンの機能を解明することを目的とし、ポリアミン代謝阻害剤による脂肪、肝臓、骨格筋における脂質蓄積の調節を試みた。第一章では脂肪細胞分化過程におけるポリアミン代謝変動につ

いて、第二章では成熟脂肪細胞の脂質蓄積におけるポリアミン代謝変動について調べ、ポリアミン代謝酵素阻害剤による影響を解析した。第三章では肝臓細胞及び筋肉細胞の脂質蓄積におけるポリアミン代謝酵素阻害剤の及ぼす影響を検討し、第四章では SpmSyn 遺伝子欠損 Gy マウス組織中の脂質量について比較した。



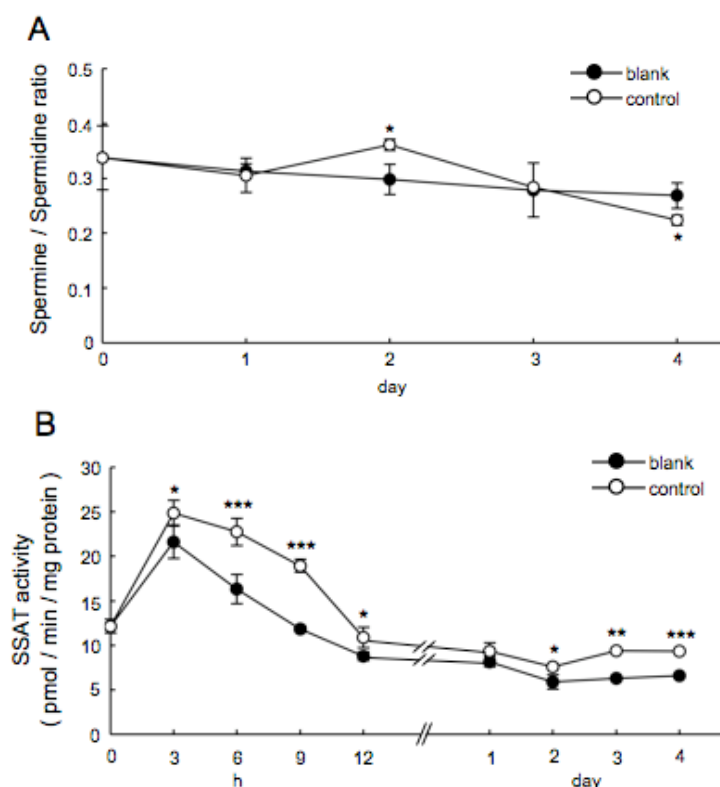
## 第一章 脂肪細胞分化過程におけるポリアミン代謝変動

本研究で用いた 3T3-L1 脂肪前駆細胞は、Insulin (INS)、isobutylmethylxanthine (IBMX)、dexamethasone (DEX) により効率よく脂肪細胞に分化し、細胞内に脂肪滴の蓄積がみとめられることから、脂肪細胞の研究に汎用されている。3T3-L1 細胞に、ポリアミン前駆体 Put を合成するオルニチン脱炭酸化酵素 (ODC) 阻害剤  $\alpha$ -Difluoromethylornithine (DFMO) を添加することによりポリアミンを枯渇させると、分化が抑制されることが報告されており、脂肪細胞分化にポリアミンが必要であることが示唆されている [11]。また 3T3-L1 細胞の分化過程では、ODC および S-adenosylmethionine decarboxylase (AdoMetDC) の活性が変動し、とくに ODC 活性は分化誘導剤添加直後 4 時間目に著しく上昇する。それとは対照的に、SpdSyn、SpmSyn の活性に大きな変動はなく、分化にともなって 7 日目に Spd 量が増加するというポリアミン量の変動から、ポリアミン分解経路の代謝酵素活性の変化が考察されている [12]。

そこで本章では、3T3-L1 脂肪前駆細胞を用いて、脂肪細胞分化過程におけるポリアミンの役割を解析することを目的として、これまで測定されていない、ポリアミン分解経路の一つである SSAT 活性および、ポリアミン代謝酵素阻害剤として SpdSyn 阻害剤、SpmSyn 阻害剤添加による脂肪細胞分化に及ぼす影響を調べた。第一節では、脂肪細胞の分化過程におけるポリアミン代謝変動について、第二節では、ポリアミン代謝酵素阻害剤による細胞内ポリアミン量の変化が脂肪細胞分化に及ぼす影響について調べ、第三節ではポリアミン代謝により生成する酸化物と脂肪細胞分化の関連性について検討した。分化誘導方法は、コンフルエントとなった細胞に、0 日目から 2 日目まで IBMX および DEX を、続く 2 日間は INS を添加した培地に変更し、その後は 10% 仔牛血清 (FBS) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) のみで培養を続けた [13]。そして、3 日目に脂肪滴の生成を観察した。

## 第一節 脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞分化過程におけるポリアミン代謝変動

はじめに、分化過程にある脂肪細胞におけるポリアミン量の測定を行った。分化誘導剤を添加した4日間において、分化誘導剤の有無による Spd 量、Spm 量の差はほとんど生じなかったが、分化誘導剤添加により Spd 量が2日目に減少、4日目に増加する傾向がみられた。Spm/Spd 比で比較すると、2日目では1.2倍に増加、4日目では0.8倍に減少することがわかった (Fig. 2)。続いてポリアミン代謝酵素の一つである SSAT 活性を測定したところ、誘導剤添加群 (control) は、12時間までと、3日目以降で活性上昇が起こることが明らかになった (Fig. 2)。分化誘導剤を添加しない細胞群 (blank) と control のどちらも3時間目に活性値は最大値を示した。blank と比較して、誘導剤添加後9時間目に最も活性値に差が生じ、その差は約1.9倍であった。これらの結果から、脂肪細胞の分化過程における細胞内 Spm/Spd 比の増加は、



**Fig. 2** Changes in Spm / Spd ratio and SSAT activity of 3T3-L1 during differentiation with IBMX, DEX and INS.

Spm / Spd ratio (A) and SSAT activity (B) in 3T3-L1 cells at indicated times from day 0 to day 4 were measured. Results shown for control cells stimulated with IBMX, DEX and INS (○) and blank cells without the stimulus (●) at times shown after start of stimulation. Results represent the mean  $\pm$  S.E.. \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  compared with control.

Erwin らの報告 [12] にあるポリアミン合成酵素である ODC および AdoMetDC 活性の上昇に起因し、Spm/Spd 比の減少の一因に、SSAT 活性上昇の関与が考えられた。

## 第二節 3T3-L1 細胞分化過程におけるポリアミン合成酵素阻害剤の影響

Spm/Spd 比および SSAT 活性が変化した前節の結果から、脂肪細胞の分化過程において、ポリアミン代謝酵素活性の変動をともない細胞内ポリアミン量に変化することがはじめて示唆された。本節では、SpdSyn 阻害剤である *trans*-4-methylcyclohexylamine (MCHA)、および SpmSyn 阻害剤である N-(3-aminopropyl) cyclohexylamine (APCHA) を用いて細胞内ポリアミン量を変化させることにより、脂肪細胞分化に及ぼす影響を調べた。これらは当研究室で開発された競合阻害剤であり、ラット肝ガン由来細胞である HTC 細胞などの培養細胞において、MCHA は Spd を、APCHA は Spm を枯渇させることが報告されている [14]。一方で、細胞内の Put、Spd 及び Spm 量を加算したポリアミンの総量は変化しないため、Spd、Spm 固有の細胞機能を探る上で良いツールになるのではないかと考えた。

### (1) ポリアミン代謝酵素阻害剤を用いた 3T3-L1 細胞培養条件の検討

まず、3T3-L1 細胞にポリアミン代謝酵素阻害剤を添加するにあたり、細胞増殖に影響を及ぼさない添加濃度を検討した。12 well プレートに 3T3-L1 細胞を播種した翌日、培地中血清アミン酸化酵素による阻害剤の分解を防ぐため、ポリアミン添加実験でよく用いられている血清アミン酸化酵素阻害剤であるアミノグアニジン (AG) 1 mM 共存下、APCHA を最終濃度が 0、50、75、100  $\mu$ M となるように添加した。3 日後の細胞数を計数し、細胞増殖への影響を評価した。その結果、AG を添加した細胞は、何も添加しない blank と比較して約 60% 細胞増殖が抑えられることがわかった (data not shown)。また AG 共存下では、APCHA 添加濃度が 100  $\mu$ M までの細胞には細胞増殖に差はなかった。脂肪細胞では、細胞内のアミン酸化酵素により産生される過酸化水素が分化に関与していることが報告されていることから [15]、AG 添加により、細胞内外のアミン酸化酵素が阻害され増殖に影響を与えたのではないかと考え、以降の実験では AG を用いずに阻害剤を添加することとした。続いて、12 well

プレートに細胞を播種し、翌日、MCHA および APCHA を最終濃度が 50、100、200、250  $\mu\text{M}$  となるように添加し、細胞数を計測した。その結果、MCHA、APCHA とともに 100  $\mu\text{M}$  までは細胞増殖に影響を及ぼさず、200  $\mu\text{M}$  以上ではほとんどの細胞が死に至ったことから、阻害剤添加濃度を 100  $\mu\text{M}$  とした。

## (2) ポリアミン代謝酵素阻害剤添加による細胞内ポリアミン量への影響

MCHA および APCHA は強力な競合阻害剤であり、当研究室では、HTC 細胞やヒト肝ガン由来細胞である HepG2 細胞などの培養細胞への添加実験において細胞内の Spd、Spm をそれぞれ枯渇させることを見出している [14]。しかし本実験で用いる 3T3-L1 細胞への添加は今まで報告がなく、さらに培地に AG が含まれず、培地に含まれる血清中アミン酸化酵素によるアミン化合物阻害剤の分解による影響も予想される。ここでは、阻害剤添加時の細胞内ポリアミン量を測定し、酵素活性阻害による細胞内ポリアミン量の変動効果を検討した。続いて、阻害剤存在下における分化誘導過程のポリアミン量の変化を調べた。MCHA 添加による Spd、APCHA 添加による Spm それぞれの減少状態における分化への影響を調べるため、実験条件として細胞播種の翌日より阻害剤を含む培地に交換し、3 日間の前培養期間を経てあらかじめポリアミン量を減少させた細胞に分化誘導剤を添加し、2 日ごとの培地交換時にも阻害剤を含有させた。

### (a) MCHA 添加による細胞内ポリアミン量変動

MCHA を添加した細胞では control と比べて 1 日目まで Spd 量の減少および Spm 量の増加がみられ、2 日目以降では Spd 量が徐々に回復した。その結果、誘導剤添加により、MCHA 添加細胞では Spm/Spd 比が 1 日目に増加し、その後徐々に低下することがわかった (Fig. 3)。この変動は、MCHA により Spd の合成が抑制されたことで、もうひとつの基質 deAdoMet が Spm 合成に使われたため一時的に Spm 量が増加したものと考えられる (Fig.1)。その後分化の進行に伴い、細胞中に脂肪滴が形成されていくとともに Spd 量、Spm 量が共に増加し、Spd/Spm 比の低下が起きたと考えられた。とくに 3 日目以降にその傾向が強く見られた。

### **(b) APCA 添加による細胞内ポリアミン量変動**

APCHA を添加した細胞では、前培養期間終了時における Spm 量は検出限界以下であった。一方、Spd 量は control と比較して増加した (Fig. 3)。分化誘導剤添加後の Spd 量は 3 日目以降で徐々に増加していくことがわかった。Spm 量は、分化誘導後も変動はなく、全て検出限界以下であった。

これらの結果より、阻害剤添加によるポリアミン量の変化は、他の細胞に用いた報告と同様であり、AG を添加しない 3T3-L1 細胞においても MCHA および APCA の効果を確認できた。また MCHA 添加群、APCHA 添加群どちらにおいても、誘導剤添加後 3 日目以降で Spd 量の増加がみられ、脂肪細胞の分化にポリアミン代謝が関わることを示唆している。

### **(3) ポリアミン代謝酵素阻害剤添加による脂肪細胞分化への影響**

つづいて、3T3-L1 細胞においてもポリアミン減少が認められた MCHA および APCA が、脂肪細胞分化にどのような影響を与えるかを調べるため、細胞内に蓄積した脂肪滴を染色する Oil Red O 染色、細胞内 TG 量、解糖系酵素である Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 活性により分化への影響を評価し、また阻害剤添加による SSAT 活性への影響についても調べた。また、ポリアミン合成酵素 AdoMetDC の阻害剤である Methylglyoxal bis(guanyldiazide) (MGBG) を添加したマウス脂肪前駆細胞 Ob1771 細胞へのポリアミン添加により、GPDH 活性が上昇することが報告されており [16]、GPDH 活性の測定により脂質合成の指標となるだけでなく、細胞内ポリアミン量の変動と GPDH との関連性を検討した。

#### **(a) MCHA 添加の脂肪細胞分化に及ぼす影響**

MCHA を添加し、細胞内 Spd 量を減少させた脂肪前駆細胞を分化誘導したところ、Oil Red O 染色量が減少し、脂質蓄積の指標である細胞内 TG 量が control と比べて、およそ 0.5 倍に低下することがわかった (Fig. 3)。このとき GPDH 活性は、およ

そ 0.7 倍に低下した (Fig. 3)。このことから、MCHA は脂肪細胞分化を抑制することが明らかとなった。

### **(b) APCA 添加の脂肪細胞分化に及ぼす影響**

細胞内 Spm 量を枯渇させた APCA を添加した脂肪前駆細胞を分化誘導したところ、Oil Red O 染色量が増加した。また、細胞内 TG 量が control と比べて約 2.7 倍に増加し、GPDH 活性が約 2.6 倍に増加することがわかった (Fig. 3)。さらに APCA 添加群では、細胞内への脂肪滴の形成が control と比較して 1 日早く観察された。これらの結果より、APCHA は脂肪細胞分化を促進することがわかり、MCHA と APCA とでは脂肪細胞分化に対して異なる作用を示すことが明らかとなった。これまで、3T3-L1 細胞へのポリアミン添加は脂肪細胞分化に影響を与えないこと [11] が報告されており、細胞内ポリアミン比の変化が脂肪細胞分化に影響をおよぼすことを本研究ではじめて明らかにした。

### **(c) ポリアミン合成酵素阻害剤の SSAT 活性に及ぼす影響**

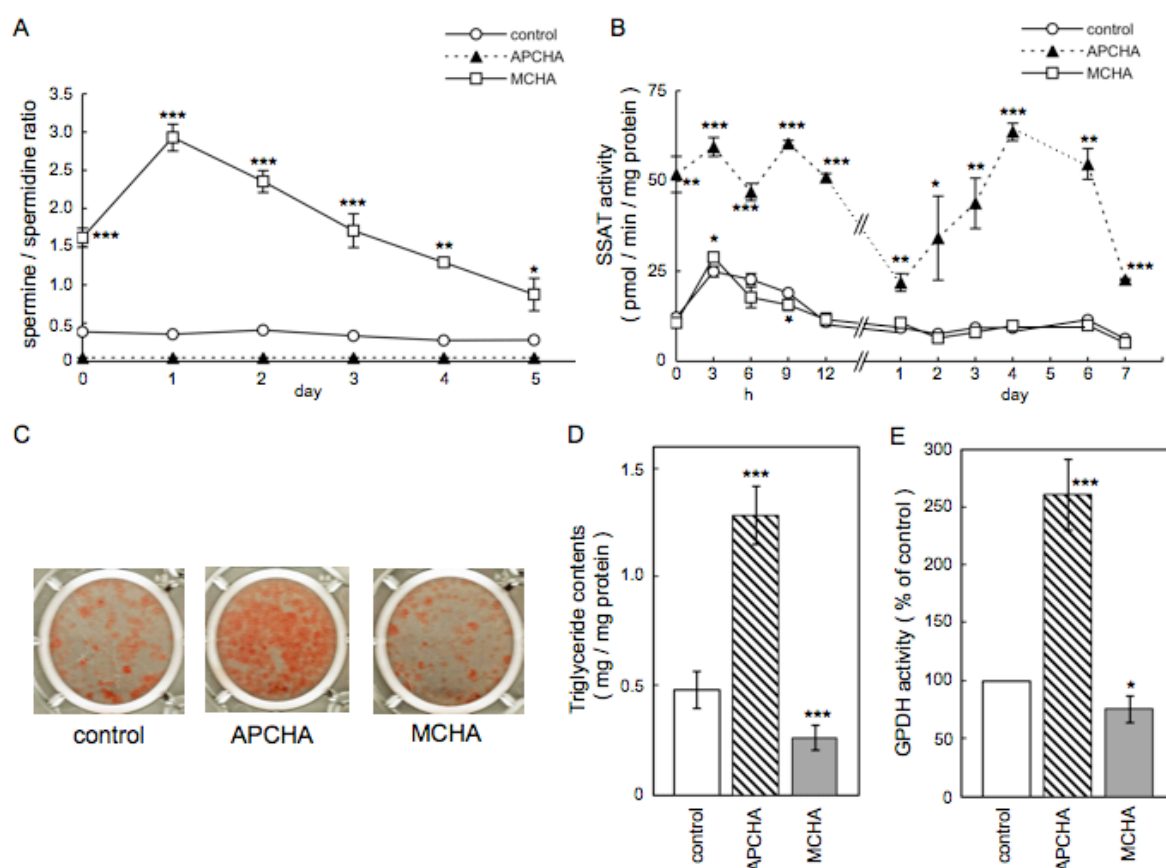
前節では分化誘導剤添加により SSAT 活性に変動が見られたことから、分化および脂質蓄積を変化させたポリアミン合成酵素阻害剤のポリアミン代謝に及ぼす影響を調べるため、SSAT 活性測定を行った。

分化を抑制した MCHA 添加群の SSAT 活性は control とほぼ変わらなかったが、分化誘導剤添加後 3 時間目において、control よりわずかに活性が上昇し、その後 9 時間目に活性が低下することがわかった (Fig. 3)。

分化を促進し、脂質蓄積を増加させた APCA 添加群では、SSAT 活性が著しく変化することがわかった。APCHA は、分化誘導処理直後のみならず、2 日目以降も細胞の形態変化に伴って活性を上昇させた。活性を最も増加させた時点は、4 日目の 6.8 倍であった (Fig. 3)。

阻害剤存在下においても、細胞内ポリアミンの総量は、測定した範囲において control との差はなかったことから、脂肪細胞分化において Spd と Spm の存在比、あるいはそれらを維持するためのポリアミン代謝酵素の関与が示唆された。分化を抑

制した MCHA の SSAT 活性は control と大きな差はなかったものの、control において SSAT 活性のピークとなる 3 時間目および blank との差が最も大きくなる 9 時間目の点で差が見られたことは、興味深い知見と思われる。さらに APCA 添加群の SSAT 活性変動は control と比較して著しいものの、細胞内 Spd 量は減少せず、むしろ増加傾向を示したことから、APCHA そのものが SSAT 活性を変化させている可能性も考えられる。本節で得られた結果は、脂肪細胞分化において、ポリアミン量の変化だけでなく、今回測定していない他の代謝酵素を含めたポリアミン代謝が変動する可能性を示唆している。



**Fig. 3 The effect of APCA or MCHA on adipocyte differentiation.**

Spm/Spd ratios (A) and SSAT activity (B) in 3T3-L1 cells treated with MCHA or APCA for day -3 to day 11 were measured during differentiation. Results shown for control cells (○ with solid line), MCHA-treated cells (□ with solid line) and APCA-treated cells (▲ with dotted line). (C) Cells were stained with Oil Red O at day 10 after the stimulus. (D) TG contents were measured at day 11. (E) GPDH activity was measured at day 7. Results represent the mean  $\pm$  S.E.. \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  compared with control.

### 第三節 脂肪細胞分化におけるポリアミン代謝酵素の影響

APCHA により活性が上昇した SSAT 活性は、ポリアミンのアセチル化を介する代謝経路の律速酵素として知られている。ポリアミン酸化酵素 (PAO) やスベルミン酸化酵素 (SMO) などを経るポリアミン分解経路では、過酸化水素やアクロレインといった酸化物質が発生する。脂肪細胞において、酸化物質はインスリンシグナルとして作用し、脂質代謝に影響を及ぼすことが知られており、チラミンやベンジルアミンなどのアミン類が、アミン酸化酵素由来の酸化物によりインスリン様作用を示すことが報告されていることから [15]、同じくアミノ基を有するポリアミンおよびポリアミン代謝酵素由来の酸化物にも同様の作用が予想できる。

そこで、本節では SSAT 活性を著しく変化させた APCHA による分化促進とポリアミン代謝酵素の関連性について、APCHA とポリアミン代謝酵素阻害剤を併用することにより検討した。ポリアミン代謝酵素阻害剤として、PAO および SMO の選択的阻害剤である MDL72527 を選択した。さらに、抗酸化剤である N-acetylcysteine (NAC) を用いて酸化物の影響についても検討した。実験条件は、細胞増殖および分化に影響のない濃度を検討した結果、5  $\mu$ M MDL72527 を APCHA と同様に、NAC は過去の報告 [17] に従って 5 mM を分化誘導剤添加の前日より添加し、それぞれ分化誘導した。

#### (1) ポリアミン代謝酵素活性変化と脂肪細胞分化の関連性の検討

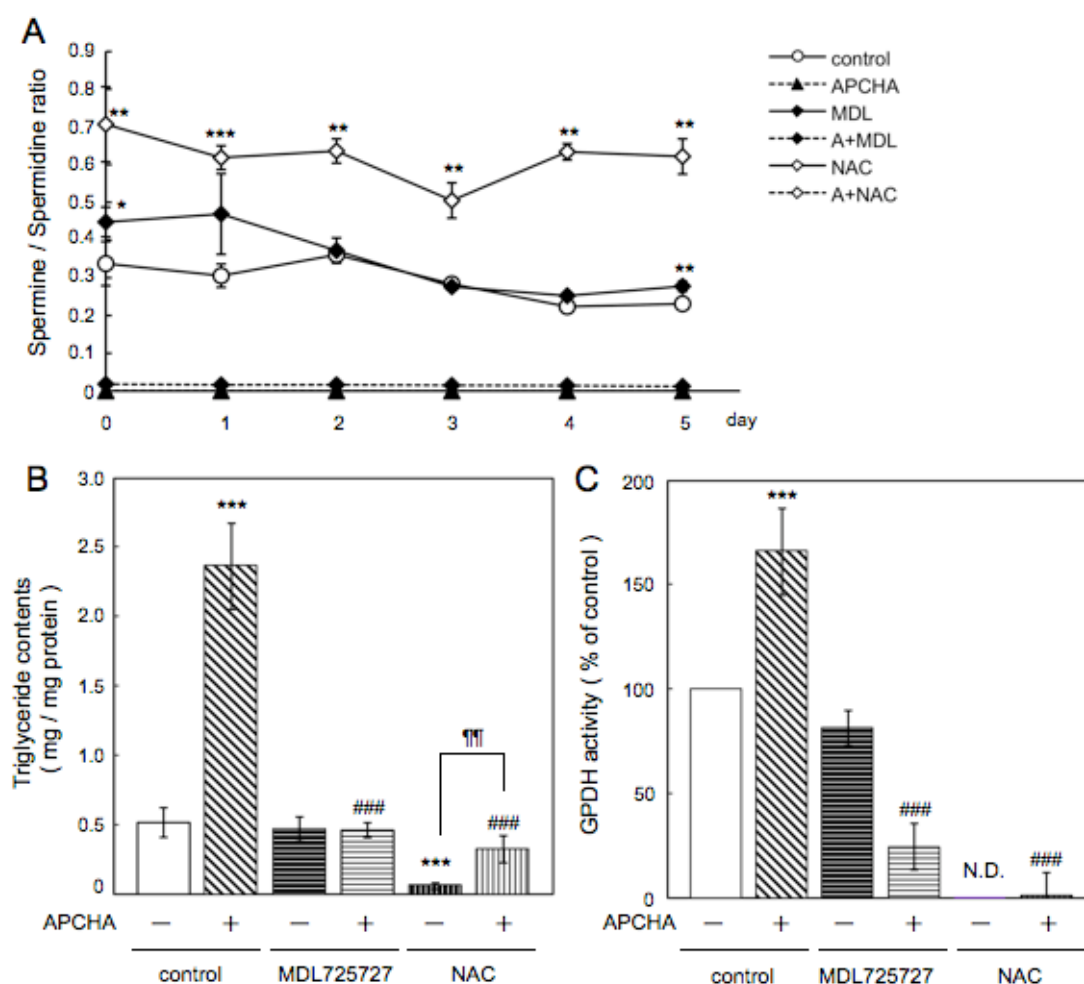
MDL72527 は 1 日目までの Spm/Spd 比を増加させる傾向にあったが、2 日目以降では control と差がなかった。NAC はポリアミン量を増加させることがはじめてわかり、Spm/Spd 比は control と比較して約 2.3 倍であった。APCHA との併用では MDL72527 および NAC どちらも、これまでと同様に Spm 量が検出限界以下まで低下した (Fig. 4)。

分化に影響を及ぼさない濃度の MDL72527 添加による TG 量および GPDH 活性は control と差がなく、MDL72527 と APCHA の併用では、APCHA による TG 量および GPDH 活性の増大効果を control と同程度まで抑えることがわかった (Fig. 4)。



NAC は分化を完全に抑制した。TG 量は control よりも減少し、GPDH 活性は検出限界以下であった。NAC と APCA との併用により、APCHA の TG 量および GPDH 活性増大効果は完全に抑えられた。一方、NAC のみでは観察されなかった脂肪滴形成が APCA の併用により観察され、control と同程度まで TG を蓄積することが明らかとなった。しかし GPDH 活性はほとんど検出できなかった (Fig. 4)。

これらの結果は、APCHA による分化促進効果には、ポリアミン代謝酵素活性の上昇が関与しており、ポリアミン代謝により生成する酸化物の関与を示唆していると考えられた。さらに、分化を完全に抑制する NAC 添加によっても APCA 併用によ



**Fig. 4 The effect of MDL72527 and NAC on APCA-enhanced differentiation of 3T3-L1 cells.**

Cells were treated with MDL72527 (5  $\mu$ M) in the presence or absence of APCA. Cells were pretreated with NAC (5 mM) 1 day prior to induction for differentiation. (A) spermine/spermidine ratios, (B) Triglyceride contents at day 11 and (C) GPDH activity at day 8 were analysed after stimulus for differentiation. Results shown for control cells (○ with solid line), treated with APCA (▲ with dotted line) and MDL72527 (◆ with solid line), MDL72527 with APCA (◆ with dotted line), NAC (◇ with solid line) and NAC with APCA (◇ with dotted line). Results represent the mean  $\pm$  S.E.. \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  compared with control. ###  $p < 0.001$ , ##  $p < 0.01$ , #  $p < 0.05$  compared with APCA-treated cells. ¶¶  $p < 0.01$  compared with NAC-treated cells. N.D., not detectable.

り脂肪滴が確認されたことから、APCHA の効果発現に NAC による分化抑制経路とは一部異なる作用機序があることが推察された。

### 小括および考察

本章では、脂肪細胞分化過程における細胞内ポリアミン量の役割を解析することを目的とし、分化過程におけるポリアミン量の経時的変化およびポリアミン分解経路の酵素として、SSAT 活性の測定を行なった。細胞内において、総ポリアミン量、Spd と Spm の存在割合などは恒常性が保たれることが知られているが、3T3-L1 細胞の分化過程においては Spd 量および Spm 量の大きな変動はないものの、Spd/Spm 比では変動することがわかった。また分化誘導剤添加により SSAT 活性上昇もみられ、Spd/Spm 比の変動要因の一つであると考えられた。

ポリアミン合成酵素阻害剤である MCHA および APCHA を用いて、細胞内ポリアミン量を変化させた細胞の分化は、Spd 量を減少させる MCHA 添加により抑制され、Spm 量を減少させる APCHA 添加により促進されることがわかり、細胞内ポリアミン量の変化が脂肪細胞分化を変化させることをはじめて明らかにした。さらに APCHA による分化促進効果は、SSAT 活性の著しい上昇を伴うことがわかった。MDL72527 あるいは NAC の併用により APCHA の脂質蓄積増加効果が抑えられたことから、APCHA 添加により Spm 量が減少した脂肪細胞では、ポリアミンの分解経路が活性化されることがわかり、分化のシグナルとして PAO や SMO が作用する際に生成する過酸化水素やアクロレインの関与も示唆された。

## 第二章 成熟脂肪細胞の脂質蓄積におけるポリアミン代謝変動

第一章では、脂肪前駆細胞の分化過程において細胞内ポリアミン量の変化が分化に影響を及ぼし、とくに APCHA はポリアミン分解経路の一つである SSAT の活性を著しく上昇させ、脂質蓄積を増加させることがわかった。この結果は、Gy マウスやシュナイダーロビンソン症候群の報告から、SpmSyn 活性あるいは Spm 量の減少は脂質蓄積を抑制するという当初の予想とは反するものであった。しかし、生体内における脂肪組織は、少なくとも第一章において検討に用いた未分化の脂肪前駆細胞と、脂肪滴を形成した成熟脂肪細胞の両者が存在している。Gy マウスでは脂肪組織が観察されないことや、シュナイダーロビンソン症候群でみられるやせ [8,10] には、成熟脂肪細胞における脂質蓄積が関与している可能性を考えた。また、Zucker ラットの脂肪組織中でのポリアミン量増加 [3] や、ポリアミンのラット脂肪細胞におけるインスリン結合性の増強 [4] も、ポリアミン量の変動と成熟脂肪細胞における脂質蓄積の関連性を示唆するものと考えられる。

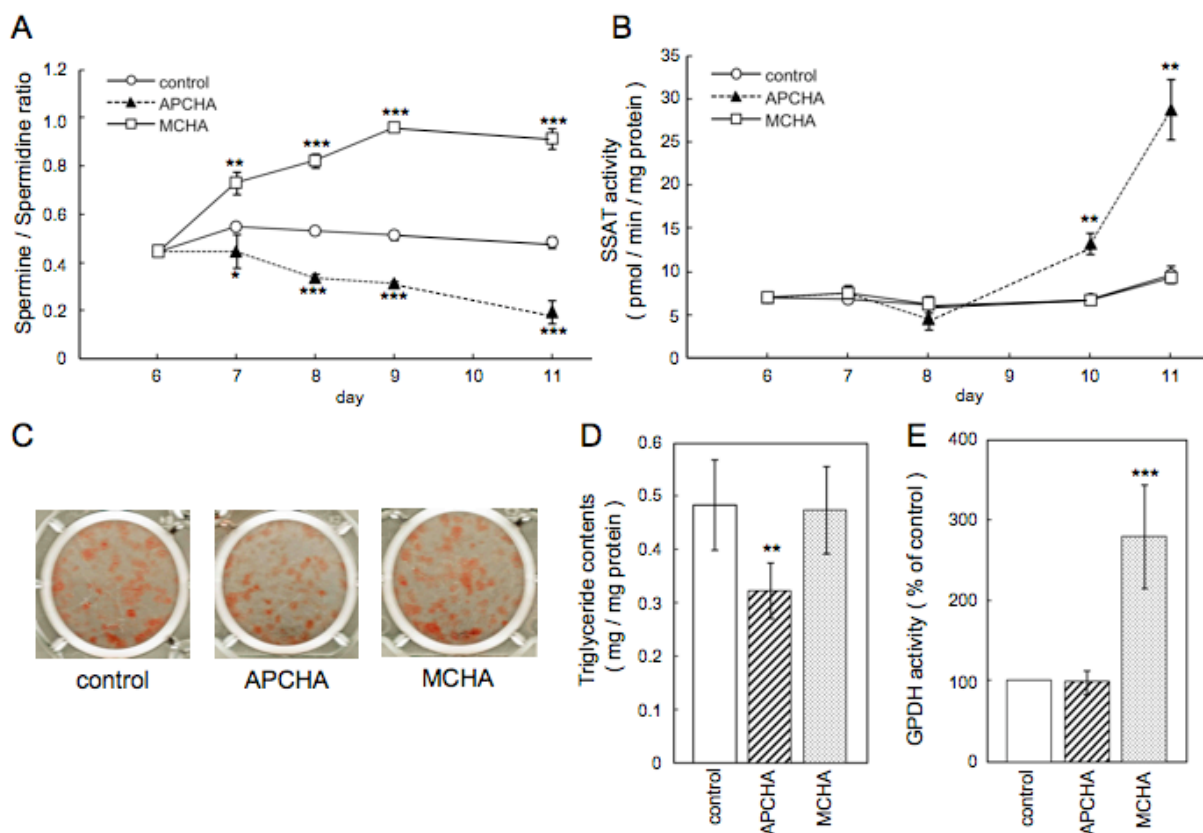
そこで本章では、成熟脂肪細胞の細胞内ポリアミン量変化が脂質蓄積に及ぼす影響を調べることを目的とした。ポリアミン代謝酵素阻害剤による内在性ポリアミン量の減少は、細胞分裂により希釈されて起こるとされているが、分化した脂肪細胞は細胞増殖が低下しているため、まず第一節では、本実験条件においてもポリアミン代謝酵素阻害剤添加による細胞内ポリアミン量変化が起こるかどうかを検討した。続いて、阻害剤添加が及ぼす脂質蓄積への影響を Oil Red O 染色、TG 量および GPDH 活性測定により評価した。第二節では、阻害剤による脂質代謝への作用機序を探るために、まず SSAT 活性の関与を検討した。なお阻害剤の添加濃度は、第一章と同様に 100  $\mu$ M とし、分化誘導 6 日目の、脂肪滴を蓄積した成熟脂肪細胞に MCHA あるいは APCHA を添加後、培養を継続し実験を行った。

## 第一節 成熟脂肪細胞の脂質蓄積におけるポリアミン合成酵素阻害剤の影響

### (1) 成熟脂肪細胞の脂肪蓄積における MCHA の影響

細胞増殖がほとんど起こらない成熟脂肪細胞においても、MCHA 添加の翌日より細胞内 Spd 量の減少および Spm 量の増加がみられ、Spd 量は最大で約 0.5 倍まで減少、Spm 量は最大で約 2.3 倍まで増加した。Spm/Spd 比は MCHA 添加の翌日より上昇し、control と比較し約 1.9 倍まで増加した (Fig. 5)。分化過程において変動のあった SSAT 活性は、control と比べて差がなく、分化誘導後はほとんど一定であった。

また、脂質蓄積量の指標である Oil Red O 染色量は MCHA 添加により control と比べて増加する傾向にあった。TG 量には差が見られなかったが、GPDH 活性は control より約 2.8 倍増加することがわかった (Fig. 5)。



**Fig. 5 The effect of MCHA or APCHA on lipid accumulation in mature adipocytes.**

The differentiated cells were treated with MCHA or APCHA from day 6. Results shown for control cells (○ with solid line), MCHA-treated cells (□ with solid line) and APCHA-treated cells (▲ with dotted line). Spm/Spd ratios (A) and SSAT activity (B) were measured at indicated times from day 6 to day 11. (C) The effect of inhibitors on lipid accumulation. Cells were fixed and stained with Oil Red O at day 10. (D) Triglyceride contents at day 11 and (E) the activity of GPDH at day 14 were measured. Results represent the mean  $\pm$  S.E.. \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  compared with control.

成熟細胞への MCHA 添加は前駆脂肪細胞への添加とは異なり、GPDH 活性の増加から脂質代謝の亢進が推測されたが、Oil Red O 染色と TG 量に相関性はみられなかった。Ob1771 細胞において、ポリアミン合成酵素阻害剤である MGBG とポリアミンを併用した場合に GPDH 活性の上昇が報告されており [16]、ポリアミン量の変動により活性が変化したとも考えられるが、詳細な検討が必要である。前駆脂肪細胞と成熟脂肪細胞とで MCHA に対する応答が異なることから、細胞の状態によりポリアミンの役割が異なることが示唆された。

## (2) 成熟脂肪細胞の脂肪蓄積における APCA の影響

成熟脂肪細胞への APCA 添加により、添加の翌日から細胞内 Spm 量の減少および Spd 量の増加がみられた。Spd 量は control と比べて約 1.5 倍増加、Spm 量は約 0.4 倍まで低下し、Spm/Spd 比は 0.3 倍まで減少した。SSAT 活性は 8 日目以降より徐々に上昇し、11 日目には control と比べて約 3 倍にまで上昇することがわかった (Fig. 5)。

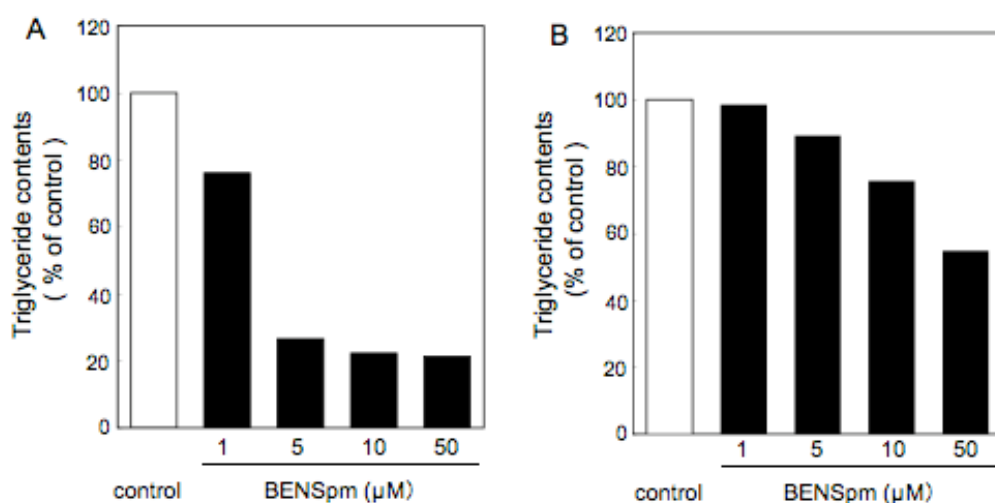
さらに APCA 添加により、その後の脂質蓄積量が control と比べて減少することがわかった。Oil Red O 染色量が減少し、細胞内 TG 量は control と比べて約 0.6 倍に低下した。しかし GPDH 活性は control と同程度であった。TG 量が低下したにもかかわらず、GPDH 活性の変化が見られなかったのは、脂質合成よりも蓄積した脂質の分解など、他の脂質代謝経路の関与が考えられた。成熟脂肪細胞への APCA 添加の効果も、前駆脂肪細胞の分化過程における結果とは異なることが明らかとなった。

これらの結果より、ポリアミン合成酵素阻害剤としての MCHA と APCA は、脂質蓄積における効果が異なることが明らかとなった。さらに、脂肪前駆細胞の分化過程と成熟脂肪細胞の脂肪蓄積過程とでは、これら阻害剤の影響が異なることから、ポリアミンは細胞の状態によりその役割が異なり、正常な脂質代謝において Spm/Spd 比を厳密に調整する必要があることが示唆された。さらに APCA は前駆細胞においても成熟細胞においても SSAT 活性の上昇を伴って脂質代謝を有意に変化させたことは、SpmSyn の作用あるいは Spm 量の変化が、ポリアミンの分解経路を介して脂質代謝に影響を与える可能性を示唆している。

## 第二節 脂質蓄積における SSAT 活性誘導剤の影響

SSAT 過剰発現マウスでみられる白色脂肪組織の減少は、SSAT 活性の上昇により、その基質であるアセチル CoA が大量に消費されたためと考察されている [7]。APCHA 添加による脂質蓄積量の減少にも SSAT 活性上昇をともなっていたが、本実験における SSAT 活性の上昇は最大で control の 3 倍程度であり、SSAT 過剰発現マウスほどには活性が上昇しておらず、またポリアミン量の変化も異なることから、APCHA による効果とは異なる作用機序であると考えられる。

そこで SSAT 活性と脂肪細胞分化および成熟細胞の脂質蓄積の関連性を検討するため、Spm 類似物質である  $N^1, N^{11}$ -bis(ethyl)norspermine (BENSpm) の添加による影響を調べた。BENSpm は、ポリアミン代謝酵素阻害剤として、SMO および SSAT を阻害するものの、結果として遺伝子発現の増加を介して SSAT 活性を著しく上昇させる [18]。第一章では、結果として 3T3-L1 細胞の分化時に SSAT 活性が上昇し、分化を抑制した MCHA 添加では一時的な SSAT 活性の低下、分化を促進した APCHA 添加では活性の著しい上昇がそれぞれ見られた。さらに APCHA は成熟細胞への添加によっても SSAT 活性を上昇させ、脂質蓄積を抑制した。そこで、SSAT 活性を直接変動させることにより脂質蓄積に影響があるのかどうかを検討するため、SSAT 活性を上昇させる BENSpm を用いて SSAT 活性と脂肪細胞分化の関係を検討した。



**Fig. 6 The effect of BENSpm on lipid accumulation.**

Triglyceride contents in (A) differentiating cells and (B) mature cells treated with BENSpm were shown. Results represent % of control.

分化誘導剤と同時に SSAT 活性誘導剤として BENSpM を添加し、BENSpM 添加濃度は 1、5、10、50  $\mu$ M とした。その結果、試みたすべての濃度において control と比べて細胞内 TG 量が減少する傾向にあり (Fig. 6)、BENSpM 添加により脂肪細胞分化が抑制されることが示唆された。さらに成熟細胞への BENSpM 添加によっても濃度依存的に TG 量の減少傾向がみられた (Fig. 6)。

分化過程において最も TG 量を減少させた 50  $\mu$ M BENSpM 添加時の SSAT 活性は、添加後 9 時間で control の約 44 倍まで上昇し、細胞内に脂肪滴を形成した 3 日目ではさらに 600 倍以上高い値であった (Table 1)。

これらの結果より、成熟細胞への BENSpM 添加は APCA と同様に脂質蓄積を抑制することがわかった。一方、分化過程の細胞への BENSpM 添加は脂質蓄積を抑制し、APCHA 添加とは異なる結果となった。BENSpM 添加による SSAT 活性変動は APCA 添加と比べても著しく上昇しており、脂質蓄積量の減少は、SSAT 過剰発現マウスの表現型 [7] である脂質量減少と一致するように思われた。これらの結果を考え合わせると、APCHA による脂質代謝への作用は、SSAT 活性の上昇だけではなく、SpmSyn 活性や Spm 量の減少に起因する他の作用経路の存在が考えられた。

**Table 1 The effect of BENSpM on SSAT activity.**

Treatment	Time of Measurement (h), after start of stimulation	SSAT activity (pmol/min/mg protein)
control	9	13.61 $\pm$ 1.46
BENSpM	9	593.22 $\pm$ 162.79
control	72	6.38 $\pm$ 1.27
BENSpM	72	4361.4 $\pm$ 175.52

## 小括および考察

本章では、細胞増殖が低下している成熟脂肪細胞においても、これまで報告された他の細胞と同様に、MCHA および APCA によるポリアミン量変化の効果が得られることがわかった。さらに成熟脂肪細胞への MCHA の添加は脂質蓄積を亢進し、APCHA 添加は脂質蓄積を抑制させており、分化過程における効果とは異なることがわかった。APCHA は成熟細胞においても SSAT 活性を上昇させ、APCHA の効果にポリアミン分解経路の関与が考えられた。BENSpm を用いて SSAT 活性を著しく上昇させると、分化過程においても成熟細胞においても脂質蓄積が抑制されたことから、APCHA による脂質代謝変動は、上昇した SSAT 活性によるものだけではなく、APCHA による SpmSyn 活性、Spm 量の減少に関わる他の要因も存在する可能性が示唆された。

これらの結果より、ポリアミンは細胞の状態により脂質代謝における機能が異なり、ポリアミン代謝酵素阻害剤が脂肪細胞における脂質代謝を調節できる可能性を示していると考えられる。さらに、作用機序の解明が必要であるが、APCHA は脂肪細胞分化を促進し、成熟細胞の脂質蓄積を抑制するため、過剰な脂質蓄積を抑制でき、生体における脂質代謝を亢進できる可能性が期待出来る。



### 第三章 筋肉細胞および肝臓細胞の脂質蓄積におけるポリアミン代謝酵素阻害剤の及ぼす影響

肝臓や骨格筋は脂肪消費臓器であり、ミトコンドリアにおける脂肪燃焼により ATP を効率よく生産する機構が存在している。しかし、肥満によって引き起こされるインスリン抵抗性により臓器内に脂質を蓄積し、全身の脂質代謝異常をさらに悪化させることが知られており、脂肪細胞だけでなく、骨格筋、肝臓における脂質代謝異常を改善することが肥満やメタボリックシンドロームの予防、改善に重要であると考えられる。

第一章および第二章において、脂肪細胞における脂質代謝へのポリアミンの関与が示唆され、とくに APCHA による脂質代謝亢進の可能性が期待出来る結果が得られた。ポリアミンは全身に広く存在し、臓器固有の機能を担っているため、第一章および第二章で得られた脂肪細胞内のポリアミン量と脂質代謝との関連性を示す結果から、脂肪細胞以外の臓器においてもポリアミン量の変動が脂質代謝に何かしらの影響を及ぼすものと推察した。

SSAT 遺伝子ノックアウトマウス及び SSAT 遺伝子過剰発現マウスでは、肝臓内のポリアミン量が大きく変動し体内脂質量が増減すること [7] が報告されているものの、肝臓中の脂質量についての検討報告は未だなく、肝臓内のポリアミン代謝酵素活性変動によるポリアミン量変動が肝臓中脂質蓄積に関与している可能性については知られていない。また骨格筋に関する報告では、マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞の筋管細胞への分化過程において、Spm 量の変動が起こり、さらにポリアミン分解経路である SMO 活性および SSAT 活性の上昇が報告されており [19]、ポリアミン量の変化およびポリアミン代謝酵素活性の変化が筋管細胞への分化に影響を与えていると考えられる。また、C2C12 細胞はグルコサミン (GlcN) 添加により細胞内に脂肪滴を蓄積するため、2 型糖尿病などにおける脂質代謝異常の細胞実験モデルとして用いられている [20]。

本章では、肝臓および骨格筋における脂肪滴形成とポリアミンとの関連性を調べるために、第一節では、肝臓細胞である HepG2 細胞へのオレイン酸添加による脂質蓄積、第二節では、骨格筋細胞である C2C12 細胞の筋管細胞への分化、第三節で

は、C2C12 細胞への GlcN 添加による脂質蓄積の 3 つの過程におけるポリアミン代謝変動と、細胞内ポリアミン量の変化が及ぼす影響について調べた。

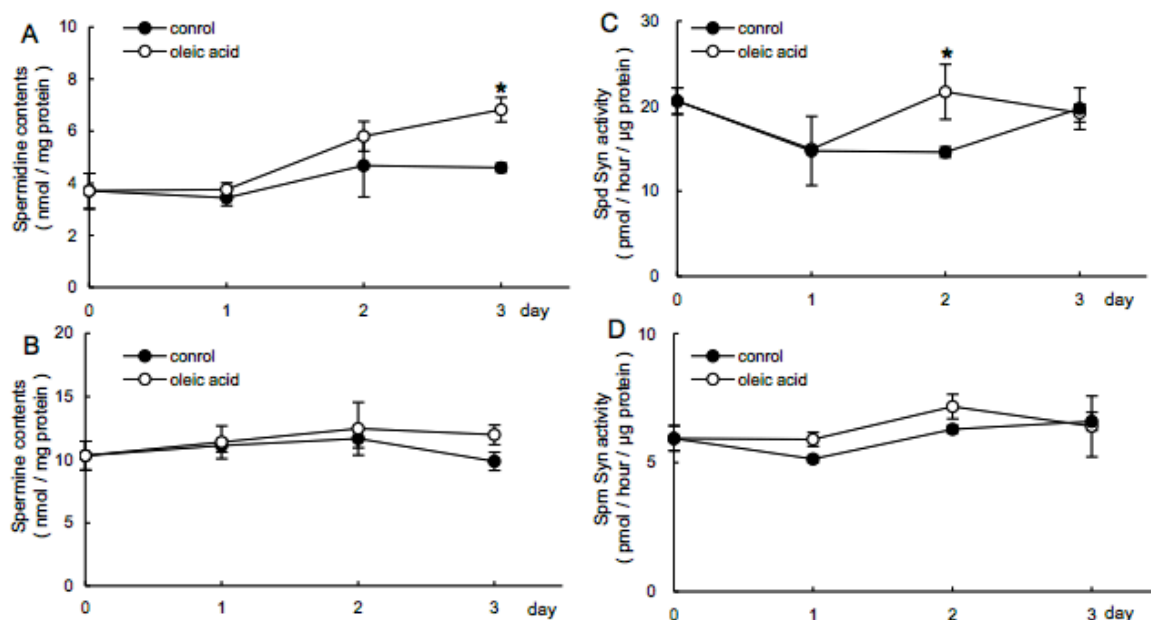
## 第一節 ヒト肝癌由来細胞 HepG2 細胞の脂質蓄積におけるポリアミン代謝変動

### (1) HepG2 細胞を用いる脂質蓄積実験系の確立

ヒト肝癌由来細胞 HepG2 は、1975 年に Aden らにより白人男性の原発性肝芽細胞腫から樹立された細胞である [21]。HepG2 細胞を用いた脂肪肝モデル作成では、培地に 1 mM オレイン酸を添加することにより、24 時間後に遊離脂肪酸量が増加し、細胞内 TG 量が約 2.5 倍増加する [22]。まず、この培養条件にもとづいて、HepG2 細胞の培養条件の検討を行った。Hozumi らの報告 [23] を参考とし、オレイン酸添加の前日 (-1 日目) に FBS をウシ血清アルブミン (BSA) に替えた無血清培地に交換し、0 日目に添加するオレイン酸の濃度検討と、脂質蓄積過程における細胞数計測を行った。そして、オレイン酸添加培地への交換による脂質蓄積量の増加を Oil Red O 染色法により評価した。20  $\mu$ M から 1 mM までの濃度範囲においてオレイン酸を添加したところ、200  $\mu$ M 以上の濃度では、肉眼観察と光学顕微鏡による観察において Oil Red O 染色に明らかな差が観察され (data not shown)、実験に用いるオレイン酸添加濃度としては最も染色に差のあった 1 mM を選択した。さらに、この 1 mM オレイン酸添加による細胞毒性の有無を調べるため、細胞計数を行ったところ、オレイン酸添加群では添加前と比較し、細胞数に有意な差はみられず、毒性はないと評価し、本条件を用いて実験を行った。

### (2) 脂質蓄積誘導による HepG2 細胞内のポリアミン代謝変動

HepG2 細胞に脂質蓄積を誘導する培養条件において、0 日目から 3 日目までの control 群とオレイン酸添加群のポリアミン量を比較した。オレイン酸添加群の細胞内 Spd 量および Spm 量は、どちらも 3 日目において control 群と比べ、増加することがわかった (Fig. 7)。脂肪細胞における脂質蓄積過程で変化のみられた SSAT 活性は、オレイン酸添加による変化はみられなかった。



**Fig. 7 Changes in polyamine contents and polyamine synthase activity of HepG2 treated with oleic acid.**

Results shown for stimulate lipid accumulation for oleic acid (○) and without oleic acid (●) in cells at times after treatment. Spermidine (A), Spermine (B) contents, Spermidine synthase (C) and Spermine synthase (D) activity were measured at indicated times from day 0 to day 3. Results represent the mean ± S.E.. \*  $p < 0.05$  compared with control.

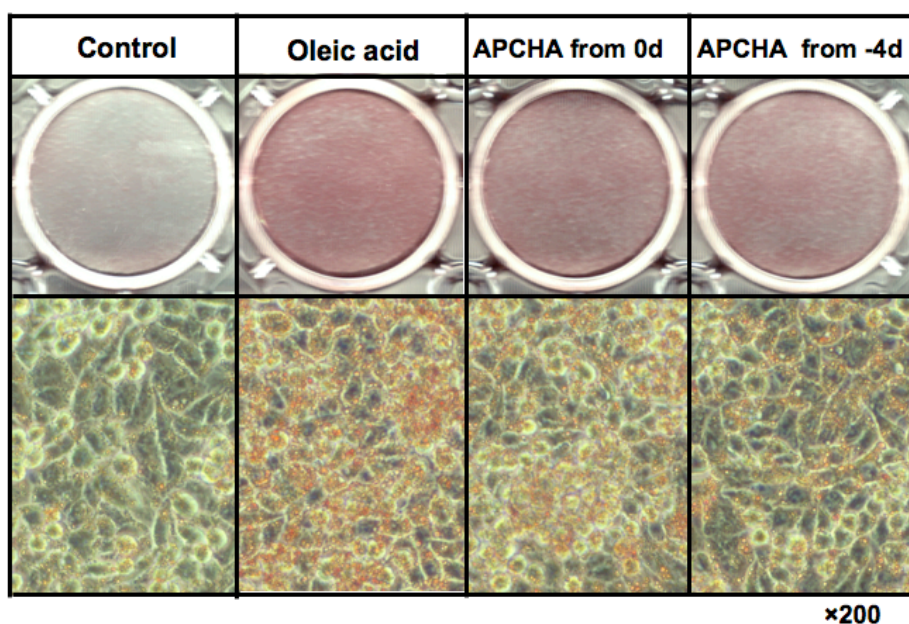
一方、オレイン酸添加群の SpdSyn 活性は、control 群と比較し、2 日目において約 1.5 倍の活性上昇があることがわかった。SpmSyn 活性は、1 日目、2 日目において 1.15 倍の活性上昇がみられた (Fig. 7)。これらの結果より、オレイン酸添加 3 日目の Spd、Spm の増加は、SpdSyn、SpmSyn の活性上昇によるものと考えられた。また、これまでアミン類縁体でない化合物によって SpdSyn 及び SpmSyn 活性が変動するという報告はあまりなく、これらの結果は細胞内ポリアミン量の制御の観点からも新たな知見を与えるものと思われた。

### (3) MCHA 及び APCA 添加の脂質蓄積に及ぼす影響

HepG2 細胞の脂質蓄積過程において、SpdSyn および SpmSyn 活性をともないポリアミン量が増加することが明らかとなったことから、MCHA または APCA 添加による細胞内ポリアミン量変化が脂質蓄積に及ぼす影響を調べた。添加濃度は、細胞増殖に影響のない濃度を検討し、20  $\mu$ M とした。培養実験条件として、ポリアミン量が十分に増加するのに必要な前培養期間をとり、オレイン酸添加の 5 日前 (-5 日目)

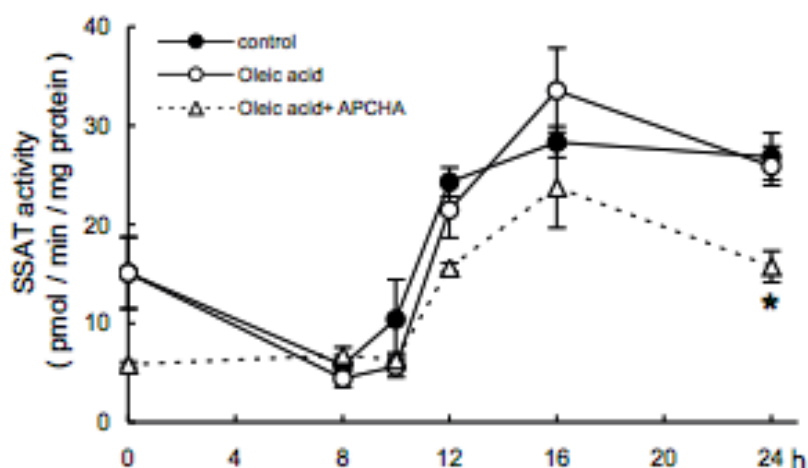
に細胞を播種し、-4 日目に 20  $\mu$ M MCHA または APCA を添加した培地に交換した後、-1 日目に阻害剤を添加した 5% BSA を含む無血清培地に交換した。その 24 時間後 (0 日目) にオレイン酸を添加し、Oil Red O 染色による脂質蓄積の評価を行った。

細胞内ポリアミン量はオレイン酸添加群と比べて、MCHA 添加により Spd 量は 50% まで減少し、Spm 量は 1.3 倍増加した。APCHA 添加により Spm 量は 20% まで減少し、Spd 量は 3 倍増加した。さらに脂質蓄積量では MCHA 添加による変化はみ



**Fig. 8 The effect of APCA on lipid accumulation in HepG2 cells.**

To induce lipid accumulation by addition of Oleic acid. APCA was treated from -4d (APCHA from -4d) or administered simultaneously with Oleic acid (APCHA from 0d). Cells were fixed and stained with Oil Red O at 1 day.



**Fig. 9 Changes in SSAT activity in HepG2 cells treated with oleic acid.**

Results shown for stimulated lipid accumulation with oleic acid (○ with solid line) and without oleic acid (● with solid line) and APCA-treated cells (△ with dotted line) in HepG2 cells at times shown after start of stimulation. Results represent the mean  $\pm$  S.E.. \*  $p < 0.05$  compared with control.

られなかったが、APCHA 添加により Oil Red O 染色量が減少し、脂質蓄積が減少することがわかった (Fig. 8)。このとき APCHA 添加細胞の SSAT 活性は、オレイン酸添加後 16 時間目において上昇傾向がみられ、24 時間後に再び control 群と同程度にまで下がった (Fig. 9)。

続いて APCHA による脂質蓄積減少が、SpmSyn 阻害作用によるものか、もしくは SpmSyn を阻害することによるポリアミン量変動によるものかどうかを調べるため、APCHA 添加時期を変更し、APCHA とオレイン酸を同時に添加した。その結果、APCHA とオレイン酸を同時に添加した群においても、オレイン酸添加群と比較し、前培養期間に APCHA を添加した群よりは差が少ないものの、脂質蓄積が減少することがわかった (Fig. 8)。APCHA 添加による脂質蓄積量の減少が Spm 量の変化よりも前に観察されたことから、APCHA そのものにも脂質量を減少させる作用があることが示唆された。

## 第二節 マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞の筋管細胞への分化過程における ポリアミン代謝変動

### (1) C2C12 細胞の筋管細胞への分化条件の確立

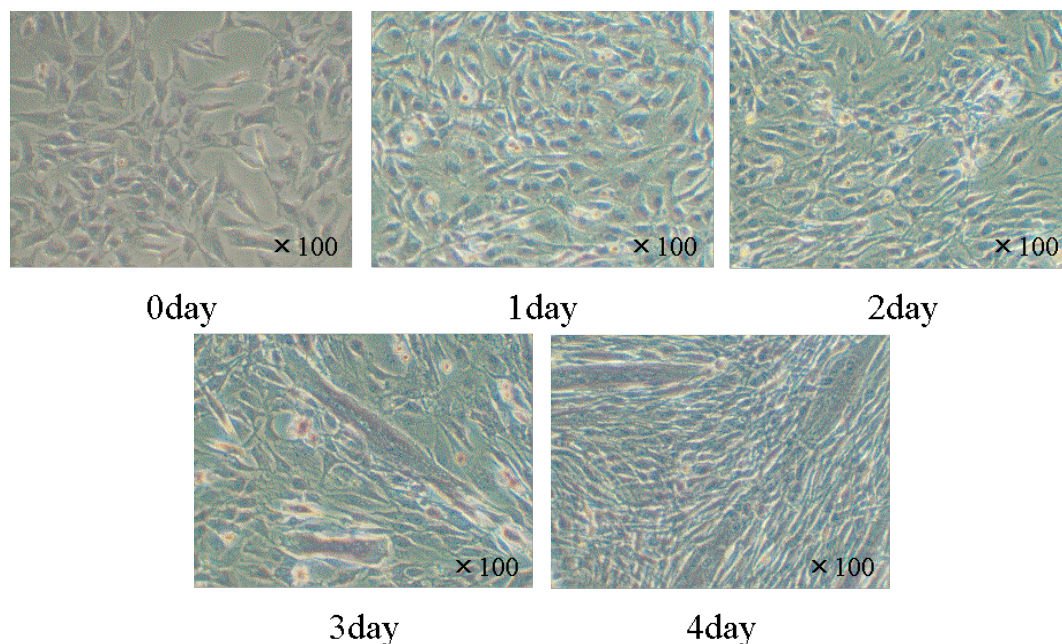
骨格筋細胞として筋肉の分化過程における研究において現在汎用されている筋芽細胞株 C2C12 細胞は、分化誘導により増殖が停止し、細胞同士が融合し、多核の筋管細胞を形成する。筋芽細胞では筋細胞を特徴づける筋特異的タンパク質の遺伝子は発現しないが、筋管細胞への分化過程において一群の筋特異遺伝子が発現することが知られている。ミオシン重鎖および軽鎖、 $\alpha$ -アクチン、 $\alpha$ -トロポミオシン、 $\beta$ -トロポミオシン、クレアチンキナーゼ (CK)、アセチルコリン受容体などがその例にあげられ、これらの発現量は筋管細胞への分化の指標とされている。

本実験では分化の指標として、顕微鏡による筋管細胞形成の進行度観察および、活性測定キットを用いて簡便に測定できる CK 活性値を用いることとした。

分化誘導条件は、Lee らの報告 [24] に従い、増殖培地として、10% FBS を含む DMEM を、分化培地として 5% ウマ血清 (HS) を含む DMEM を用いた。0.16×10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> となるように細胞を播種し、2 日間の前培養期間においてサブコンフルエン



トとなった後、分化培地に交換した。その後3日目より一部に筋管細胞の形成が見られ、4日目にはディッシュ全体で線維化を観察した (Fig. 10)。さらに CK 活性は増殖培地のみで培養を続けた細胞と比較して、約 50% 増加した。



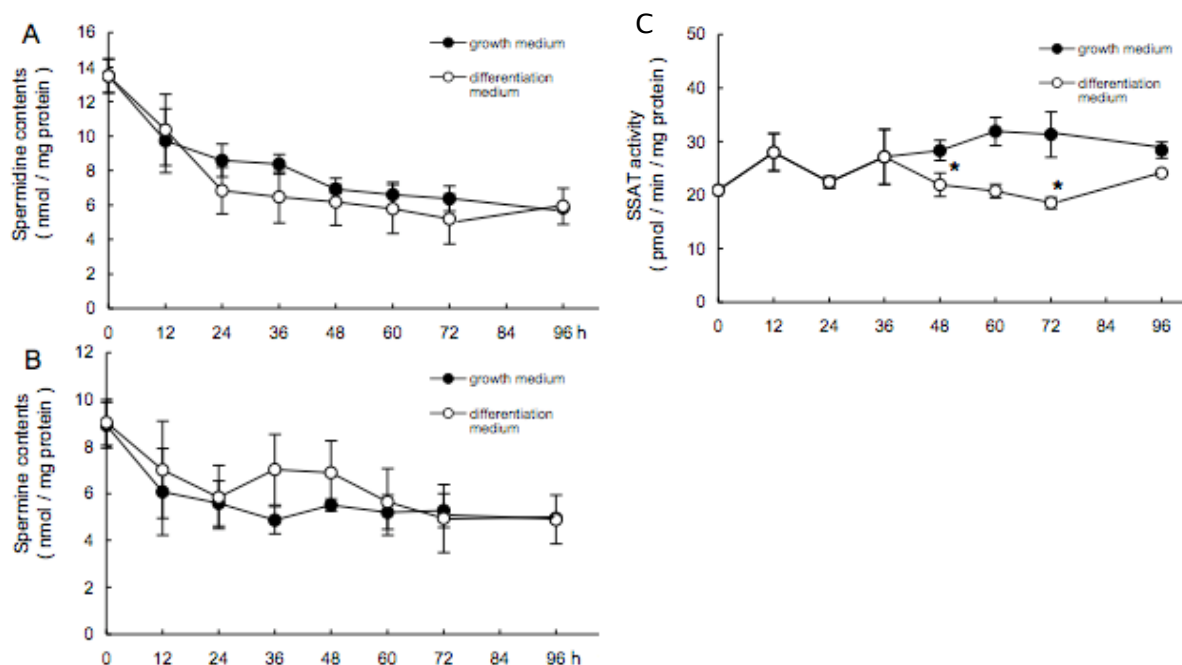
**Fig. 10 Cellular morphology during C2C12 cell differentiation.**  
Cells were fixed and stained with Hematoxylin.

## (2) 筋管細胞への分化過程におけるポリアミン代謝酵素活性変動

C2C12 細胞の筋管細胞への分化過程において、Spm 量の変動、さらにポリアミン分解経路である SMO および SSAT 遺伝子発現およびこれら酵素活性の上昇が報告されており [19]、ポリアミン量の変化およびポリアミン代謝酵素活性の変化が筋管細胞への分化に影響を与えていると考えられる。しかし、ポリアミン量の変動について経時的な比較は行われておらず、さらに分化誘導条件も異なるため、まず本実験条件におけるポリアミン量および SSAT 活性の変動について調べた。

細胞内ポリアミン量は、分化培地を用いた条件では増殖培地に比べ、Spm 量が多く、Spd 量が少ない傾向にあり、とくに 1 日目から 2 日目にかけてその差が大きく見られることがわかった (Fig. 11)。これは、増殖培地においては増殖が盛んで、よりタンパク合成が必要となるため Spd 量が増加し、増殖が抑えられた分化過程においては Spd 量が低下したと考えられた。一方、SSAT 活性は増殖培地と比べて 2 日目

以降で徐々に活性が低下することがわかった (Fig. 11)。Cervelli らは SSAT 遺伝子発現の増加と SSAT 活性上昇を報告しているが [19]、本実験とは異なる結果であった。この要因として、他の酵素活性測定など詳細な検討が必要ではあるが、Cervelli らは分化培地に HS ではなく FBS を用いていることや、細胞株の違いが影響しているのではないかと考えられた。



**Fig. 11 Changes in polyamine contents and SSAT activity in C2C12 cells during myogenic differentiation.** (A) Spermidine and (B) Spermine contents. (C) SSAT activity. Results shown for differentiation medium (○) and growth medium (●) on C2C12 cells at times shown after medium replacement. Results represent the mean  $\pm$  S.E.. \*  $p < 0.05$  compared with control.

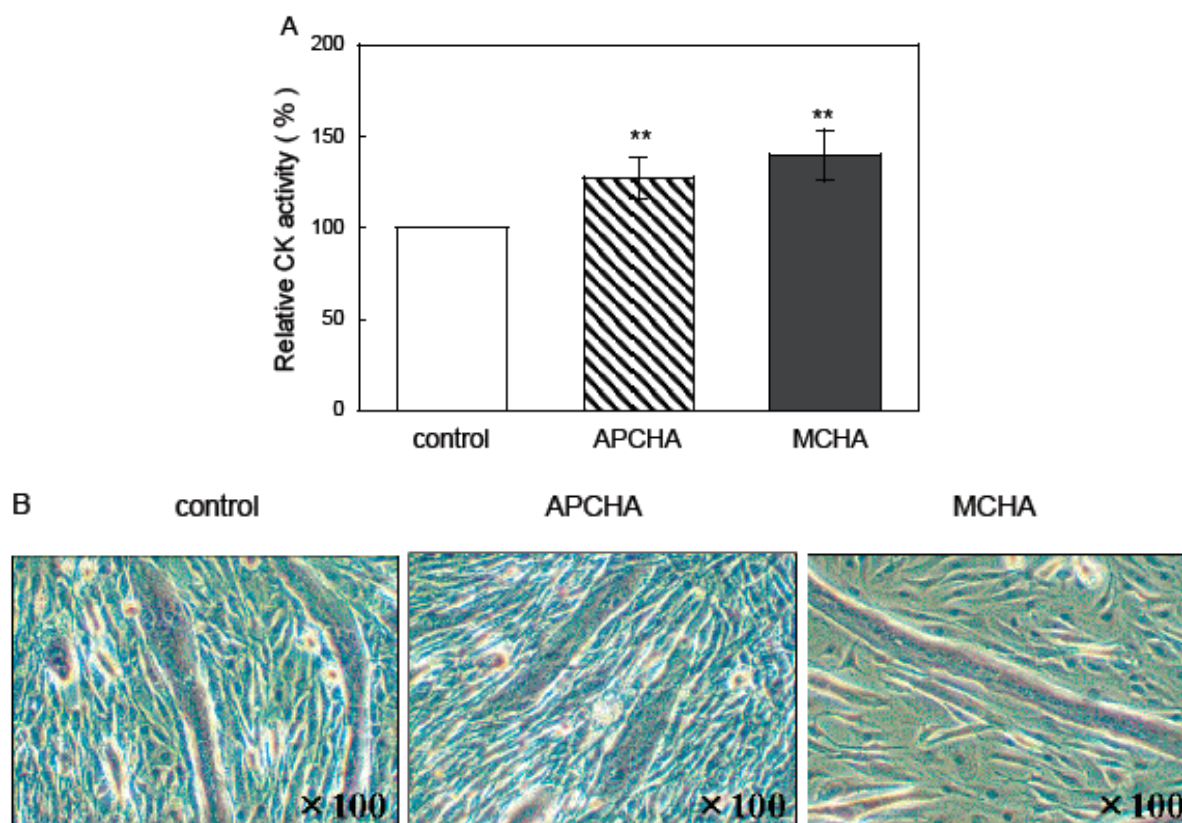
### (3) ポリアミン合成酵素阻害剤の筋管細胞分化に及ぼす影響

#### (a) MCHA および APCA 添加の分化に及ぼす影響

分化過程において、ポリアミン量の変動がみられたことから、MCHA および APCA 添加により細胞内ポリアミン量を変化させ、分化に与える影響を調べた。阻害剤の添加濃度は細胞増殖に影響のない濃度を検討し、50  $\mu$ M とした。これまでの実験同様に、細胞播種の翌日に阻害剤を添加し、0 日目までを前培養期間とし、分化誘導開始後 0 日目から 4 日目までのポリアミン量を測定した。その結果、MCHA 添

加群では control と比較して Spm 量が増加し、Spd 量が低下することが分かった。APCHA 添加群においては、control と比較して Spm 量が低下し、Spd 量が増加した。この結果から C2C12 細胞にもこれらの阻害剤が作用することが分かった。

分化誘導後 4 日目の分化の進行を CK 活性測定および筋管細胞形成の顕微鏡観察により評価した。その結果 CK 活性は control と比較して、APCHA 添加により約 25% の上昇がみられ、また MCHA 添加群では約 50% の上昇が見られた (Fig. 12)。顕微鏡観察において、APCHA 添加群では control と比べて大きな差は見られなかったものの、MCHA 添加群では細胞同士の上に隙間が見られ (Fig. 12)、細胞数の減少を確認した。この細胞数の減少は前培養期間では観察されず、分化誘導後にみられた。顕微鏡観察において、細胞融合し、形状の変化した筋管細胞の数は control と比べて変わらなかったことから、分化が進行し、CK 活性の高い細胞が生存したことが CK 活性増加の一因であると考えられた。



**Fig. 12 The effect of MCHA or APCHA on C2C12 cells differentiation.**

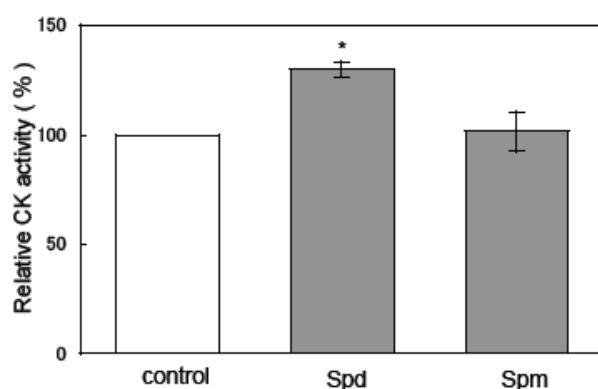
The activity of CK at day 4 were measured. (A) C2C12 cells were treated with MCHA or APCHA from day -2 to day 4. (B) Cells were stained with Hematoxylin.. Results represent the mean  $\pm$  S.E.. \*\*  $p < 0.01$  compared with control



阻害剤添加による CK 活性上昇は、MCHA 添加細胞への Spd の同時添加および APCHA 添加細胞への Spm の同時添加によって抑えられた。さらに MCHA 添加細胞への Spd 添加により、細胞数の減少も抑制された。このことから筋管細胞への分化に Spd が重要な役割を果たしていることが示唆され、さらに増殖、分化過程および分化後の細胞において阻害剤の感受性が異なったことから、細胞状態によってポリアミンの役割が異なると考えられた。

#### (b) ポリアミン添加の分化に及ぼす影響

先の結果から筋管細胞への分化において、Spd が重要な役割を果たしていると示唆されたため、ポリアミンを直接添加することによる分化への影響を調べた。添加濃度は細胞増殖に影響のない濃度を検討し、1  $\mu$ M とした。添加濃度が低濃度であったためか、ポリアミン添加後の細胞内ポリアミン量に変化はなかったものの Spd 添加により CK 活性の増加がみられた。一方、Spm 添加では CK 活性を変化させないことがわかった (Fig. 13)。分化過程および分化誘導後の細胞生存率は、顕微鏡観察ではどちらも、Spd、Spm 添加群ともに control と比較して、差はなかった (data not shown)。これらのことから、CK 活性は筋肉中のエネルギー代謝を示す指標でもあることから、筋肉中の Spd 量の増加は、エネルギー代謝を亢進する可能性が示唆された。



**Fig. 13 The effect of polyamine on C2C12 cells differentiation.**

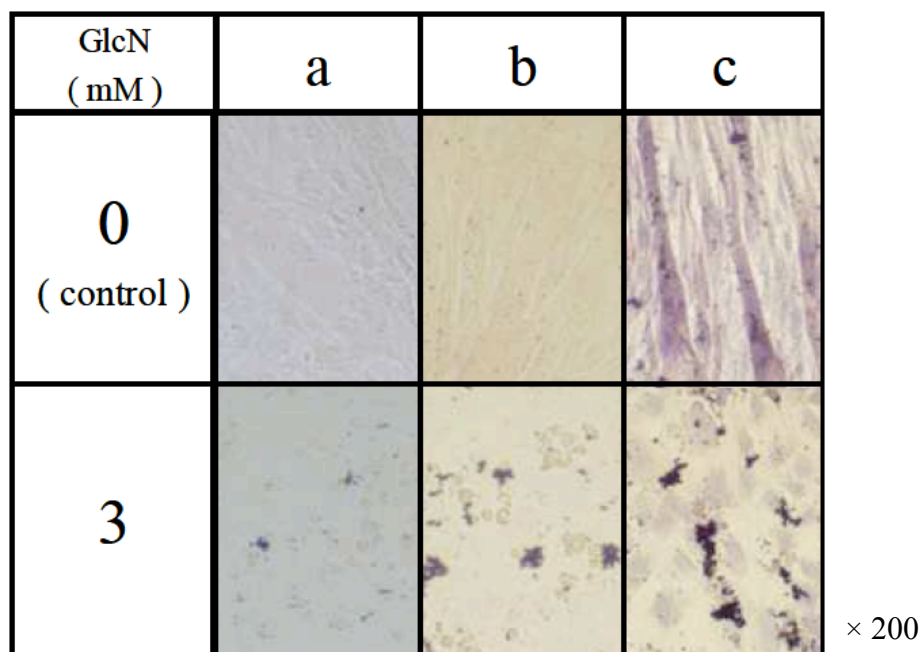
The activity of CK at day 4 were measured. Results represent the mean  $\pm$  S.E.. \*  $p < 0.05$  compared with control.

### 第三節 C2C12 細胞の脂質蓄積におけるポリアミンの代謝変動

C2C12 細胞は、成長マウスの筋再生部から樹立された細胞株であり、筋肉衛星細胞に由来するとされている。この細胞を用いることにより、未分化な間葉系細胞から、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞を含む骨髄間質細胞、筋肉への分化誘導過程を *in vitro* で検討することを可能とする。骨格筋のインスリン抵抗性は肥満や 2 型糖尿病の主要な特徴の一つであり、動物実験および臨床研究により肥満症の骨格筋中の脂質量とインスリン抵抗性の進行度は相関性を有することが知られている [25, 26]。また、2 型糖尿病患者の骨格筋でヘキサミン経路の律速酵素であるグルタミン:フルクトース 6-リン酸アミドトランスフェラーゼの活性が上昇することが知られている [27]。さらに、糖尿病動物モデルの骨格筋では、生体内のグルコサミン (GlcN) 代謝経路のひとつであるヘキサミン経路の最終生成物 UDP-N-アセチルグルコサミンが上昇する [28]。これらのことから 2 型糖尿病の骨格筋においてヘキサミン経路の刺激がインスリン抵抗性誘発高血糖を惹起すると考えられている [29]。本章では Fujita らの報告 [30] を参考に、C2C12 細胞への GlcN 添加による脂質蓄積誘導条件の検討を行い、骨格筋への脂質蓄積におけるポリアミンの影響を調べた。

#### (1) C2C12 細胞における脂質蓄積誘導条件の検討

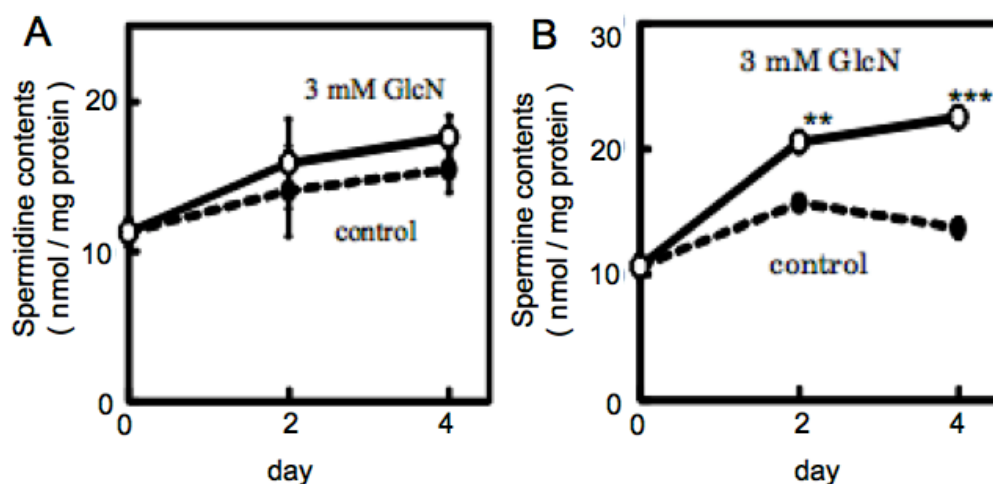
増殖培地として、10% FBS を含む High glucose DMEM を用い、 $0.16 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> となるように細胞を播種した。3 日後、2% HS を含む High glucose DMEM に 3 mM GlcN を添加した培地に交換し、脂質蓄積誘導を行った。その結果、2 日目から脂肪滴を形成し、細胞は肥大化し始め、経時的な脂肪滴の肥大化を観察した。脂質蓄積の評価は、細胞形態と脂肪滴の形成の両方を同時に観察することを目的として、Mayer's Hematoxylin - Oil Red O 共染色法を用いることとした。この方法により GlcN を添加していない control 群では筋管細胞の形成、GlcN 添加群においては筋管細胞が減少し、脂肪滴の増加を観察した (Fig. 14)。



**Fig. 14 Lipid accumulation in C2C12 cells stained by Mayer's Hematoxylin and Oil Red O.**  
**(a)** Oil Red O stained for 5 min **(b)** Oil Red O stained for 30 min **(c)** Mayer's Hematoxylin and Oil Red O stained for 30 min

## (2) C2C12 細胞の脂質蓄積におけるポリアミン代謝酵素活性変動

GlcN 添加による脂質蓄積誘導した C2C12 細胞内ポリアミン量を測定したところ、GlcN 非添加群と比較して、Spd 量には大きな差がみられなかったのに対し、Spm 量は 2 日目において約 30%、4 日目において約 60% 増加することがわかった (Fig. 15)。これらの結果は、骨格筋内の脂質蓄積に Spm 量の増加が関与していることを示すものと考えられた。SSAT 活性は、脂質蓄積誘導した細胞群は分化誘導した細胞群と比べて、2、4、6 日目において有意な差はみられなかった。Spm 量の増加により、ポリアミン分解経路を誘導すると予想したが、本実験条件におけるポリアミン量の変動は、SSAT 以外の代謝酵素あるいはポリアミン合成酵素の活性変動が関与すると考えられた。



**Fig. 15 The effect of GlcN on polyamine contents in C2C12 cells.**

(A) Spermidine contents and (B) Spermine contents in C2C12 cells were measured. Results shown for stimulated lipid accumulation for GlcN (○ with solid line) and control cells without GlcN (● with solid line) in C2C12 cells at times shown after start of stimulation. Results represent the mean  $\pm$  S.E.. \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , compared with control.

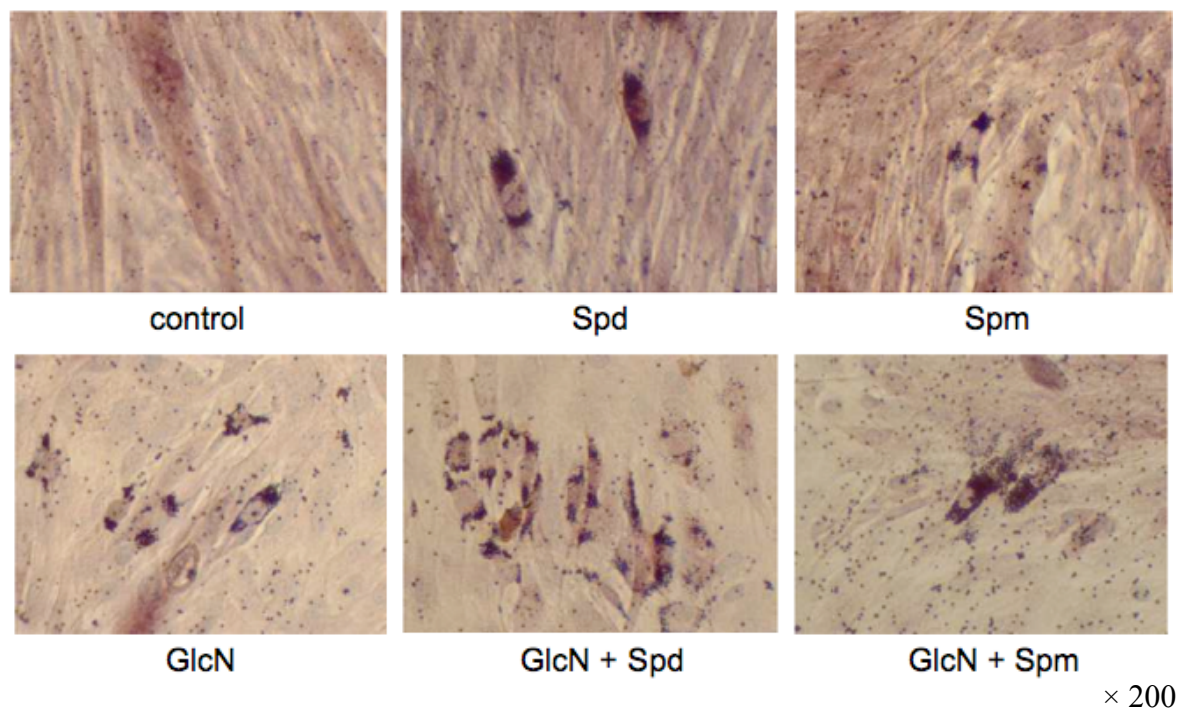
### (3) ポリアミンの脂質蓄積に及ぼす影響

GlcN 添加による脂質蓄積過程において、ポリアミン量に変動したことから、ポリアミンと脂質蓄積との関連性をさらに詳細に調べるために、ポリアミン添加により脂質蓄積がさらに誘導されるかどうかを調べた。

細胞を播種し (-3 日目)、3 日間培養後の 0 日目から 6 日目まで分化および脂質蓄積を誘導し、脂質蓄積への影響を調べた。分化誘導を行ったものを control、分化誘導培地に 100  $\mu$ M Spd および 100  $\mu$ M Spm を添加したものをそれぞれ Spd 群および Spm 群、脂質蓄積誘導を行ったものを GlcN 群、脂質蓄積誘導培地に 100  $\mu$ M Spd または 100  $\mu$ M Spm を添加した群をそれぞれ GlcN + Spd 群、GlcN + Spm 群とした。

その結果、ポリアミンを添加した Spd 群および Spm 群において、GlcN を添加していないにもかかわらず、脂質蓄積量の増加が観察されることがわかった。さらに、GlcN + Spd 群および GlcN + Spm 群は、GlcN 群と比較して、より強く脂質蓄積が誘導された (Fig. 16)。ポリアミン添加による脂質蓄積誘導作用はとくに Spd 群に強く現れ、脂質蓄積誘導による脂肪細胞様筋芽細胞への分化誘導は、Spd および Spm の添加により促進されることが示唆された。また、GlcN 非存在下によっても脂質蓄積を増加させたポリアミンに、直接の脂質蓄積作用があることが示唆された。ポリアミンは、脂肪細胞においてインスリン結合性を増強させること [4] が報告され

ており、さらにベンジルアミンやチラミンといったアミン類がインスリン様作用を示す報告 [15] もあることから、骨格筋における脂質蓄積においても、同様の作用を示す可能性が示唆された。



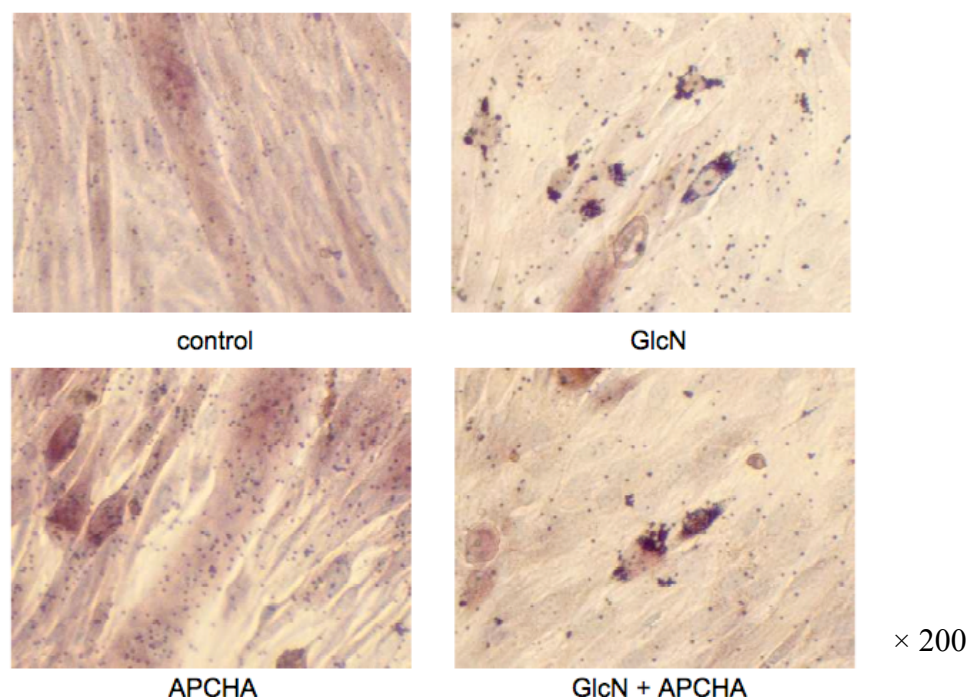
**Fig. 16 Effect of GlcN, polyamine on lipid accumulation in C2C12 cells.**  
Cells were fixed and stained with Hematoxylin and Oil Red O at day 6.

#### (4) ポリアミン合成酵素阻害剤の脂質蓄積に及ぼす影響

APCHA 添加によるスペルミン合成酵素の阻害あるいは細胞内ポリアミン量の変動が脂質蓄積に及ぼす影響を調べた。細胞播種の翌日 (-2 日目) に阻害剤を添加し、0 日目までを前培養期間とし、0 日目から6 日目まで分化および脂質蓄積誘導を行い、脂質蓄積へ及ぼす影響を調べた。分化誘導した群を control、分化誘導培地へ 50  $\mu$ M APCHA を添加した群を APCHA 群、脂質蓄積誘導を行った群を GlcN 群、脂質蓄積誘導培地へ 50  $\mu$ M APCHA 添加した群を GlcN + APCHA 群とした。その結果、control と APCHA 群を比較すると、脂質蓄積への影響はほとんどみられなかったのに対して、GlcN 群と GlcN + APCHA 群を比較すると、APCHA の添加により脂質蓄積量が減少することがわかった (Fig. 17)。このことから、細胞内 Spm 量の上昇が脂質蓄積誘導に関与する可能性、あるいは脂質蓄積誘導過程において SpmSyn 活性が上昇する



可能性が考えられた。また、APCHA 添加による脂質蓄積への影響は余剰な脂質蓄積が惹起されたときにのみ発現することが示唆された。



**Fig. 17 Effect of APCHA on lipid accumulation in C2C12 cells.**  
Cells were fixed and stained with Hematoxylin and Oil Red O at day 6.

## 小括および考察

本章では、体内における脂質代謝に関与する臓器として、肝臓および骨格筋中における脂質蓄積におけるポリアミンの関連性を調べる目的とし、肝臓細胞である HepG2 細胞中への脂質蓄積、骨格筋細胞である C2C12 細胞の筋管細胞への分化および脂質蓄積におけるポリアミン代謝変動を検討した。

HepG2 細胞へのオレイン酸添加による脂質蓄積条件では、Spd 量と Spm 量はどちらも増加し、SpdSyn および SpmSyn 活性がともに上昇することがわかった。また、APCHA 添加により脂質蓄積が減少し、さらに APCHA の前培養期間を置かずに APCHA とオレイン酸とを同時に添加した場合によっても脂質蓄積が減少したことから、HepG2 細胞の脂質蓄積には Spm 量の変化、そして SpmSyn 活性そのものも大きく関わっていることが示唆された。

C2C12 細胞の筋管細胞への分化過程では、Spd 量の減少傾向、Spm 量の増加がおきることがわかったが、本実験条件では SSAT 活性の変動はなかった。MCHA およ

びAPCHA添加により細胞内ポリアミン量を変化させると、CK活性が上昇した。さらにCK活性は、Spd添加によっても上昇したことから、細胞内ポリアミン量の変化が筋管細胞分化に影響をおよぼすことが示唆された。

C2C12細胞へのGlcN添加による脂質蓄積誘導では、Spm量が増加することがわかった。さらにポリアミン添加は、GlcNによる脂質蓄積を増強させ、その作用はSpmよりもSpdの方が強いことが明らかとなった。ポリアミンのみの添加によっても脂質蓄積が観察され、骨格筋中への脂質蓄積にポリアミンの直接的な作用が示唆された。これまで脂肪細胞において、ポリアミンの直接添加による脂質蓄積量変化に関する報告はないものの、アミン類がインスリン様作用を示すこと [15] や、ポリアミンがインスリン結合性を増強させること [4] が報告されているため、骨格筋におけるポリアミンの新たな機能を示唆する結果である。また、APCHA添加は余剰な脂質蓄積が惹起された場合にのみ脂質蓄積量を減少させるのではないかと推測された。

これらの結果から、脂肪、肝臓、骨格筋細胞の細胞種や分化過程など、細胞応答の違いによりポリアミンが脂質蓄積に果たす役割が異なるものの、APCHA添加は共通して過剰な脂質蓄積を抑制する可能性を示唆する結果が得られた。

## 第四章 SpmSyn 遺伝子欠損 Gy マウス組織中脂質量比較

APCHA 添加により細胞内 Spm 量を減少させた培養細胞では、分化および脂質蓄積に影響を及ぼすことがわかり、APCHA による SpmSyn 活性の阻害や Spm 量の減少が脂肪、肝臓、筋肉中の脂質蓄積に関与している可能性が示唆された。脂質代謝におけるポリアミン代謝の関与を調べるには、培養細胞のみならず、動物個体における検討も欠かせない。

SpmSyn 遺伝子を欠損した Gy マウスでは、低体長、低体重がみられ [8]、白色脂肪組織が見られない。シュナイダーロビンソン症候群でみられるやせ [10] は、3T3-L1 細胞への APCHA 添加実験結果からも、Spm 量減少や SpmSyn 遺伝子欠損あるいは SpmSyn 活性減少が、脂質蓄積を抑制するものと予想できる。しかし、SpmSyn 遺伝子欠損マウスの肝臓や骨格筋中の脂質量については未だ調べられていない。

そこで本章では、マウス個体における SpmSyn 活性および Spm 量の脂質蓄積に及ぼす作用を検討することを目的として、第一節では SpmSyn 遺伝子欠損である Gy 雄マウスの肝臓組織中の脂質量を調べた。第二節では Gy 雄マウスの筋肉組織における脂質量および CK 活性を調べた。

### 第一節 Gy マウス肝臓中脂質量の解析

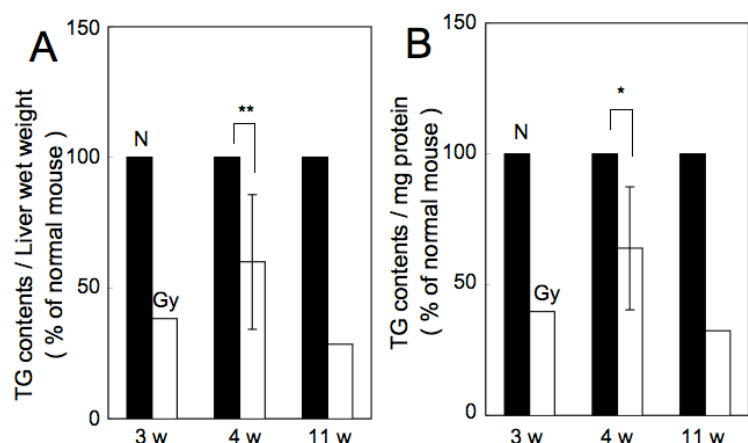
3 週齢、4 週齢および 11 週齢の Normal マウスおよび Gy マウス肝臓中総脂質を Folch 法により抽出した。総脂質中の TG 量、コレステロール (Cho) 量及び遊離脂肪酸 (NEFA) 量を比較したところ、肝臓中の総脂質量では、Gy マウスと Normal マウスとの差はなかった。

#### (1) Gy マウス肝臓中 TG 量

3 週齢の Gy マウスは Normal マウスと比べて、肝臓湿重量あたりの TG 量は 62% 減少していることがわかった (Fig. 18)。4 週齢は 40% 減少し、11 週齢では 71% 減少していた。タンパク量あたりの TG 量比較では、3 週齢では 60% 減少していることがわかった。4 週齢は 36% 減少し、11 週齢では 68% 減少していた。Gy マウス肝臓中



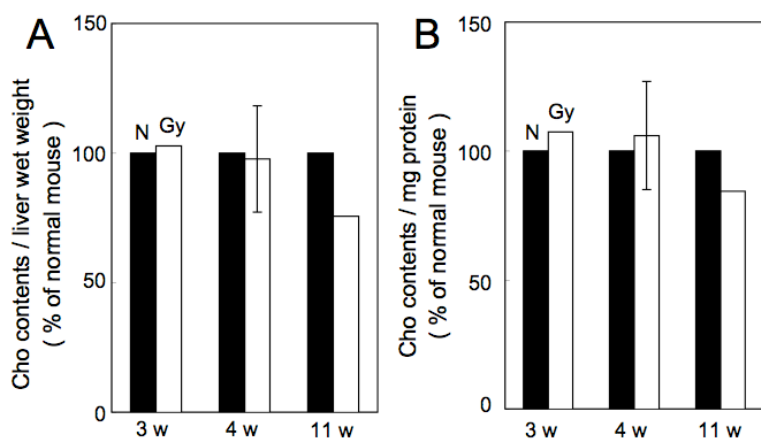
の TG 量は、検討した全ての週齢において Normal マウスと比べて減少していることがわかり、スペルミンの減少により、3 週齢以降では、肝臓中の TG 量が減少することを示唆しているものと考えられた。



**Fig. 18 TG contents in liver of Gy and Normal mice.**  
Results represent the mean  $\pm$  S.E..  
\*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  compared with control.

## (2) Gy マウス肝臓中 Cho 量

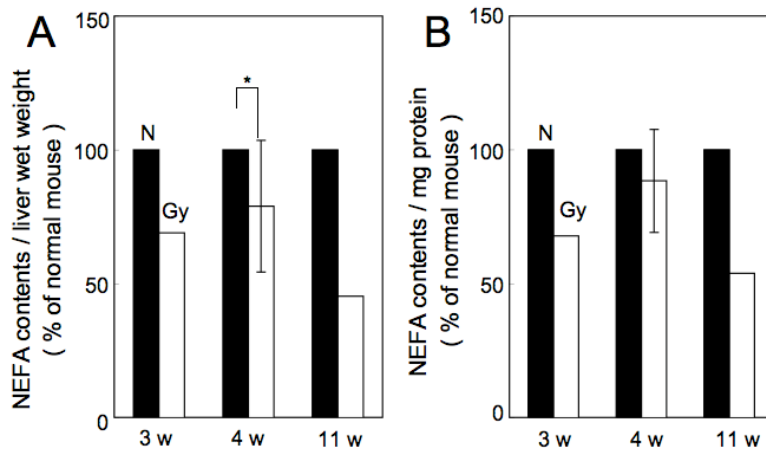
各週齢の Normal を 100% とし、肝臓湿重量あたりの Cho 量の割合及び、タンパク量あたりの Cho 量の割合について、Normal マウスと Gy マウスを比較したところ肝臓中の Cho 割合には差がないことがわかった (Fig. 19)



**Fig. 19 Cho contents in liver of Gy and Normal mice.**  
Results represent the mean  $\pm$  S.E..  
\*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  compared with control.

## (3) Gy マウス肝臓中 NEFA 量

各週齢の Normal を 100% とした。肝臓湿重量あたりの NEFA 量の割合では、Gy マウスは Normal マウスと比べて、3 週齢では 31% 減少し、4 週齢では 21% 減少し、11 週齢では 55% 減少することがわかった (Fig. 20)。



**Fig. 20 NEFA contents in liver of Gy and Normal mice.**

Results represent the mean  $\pm$  S.E..  
 \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  compared with control.

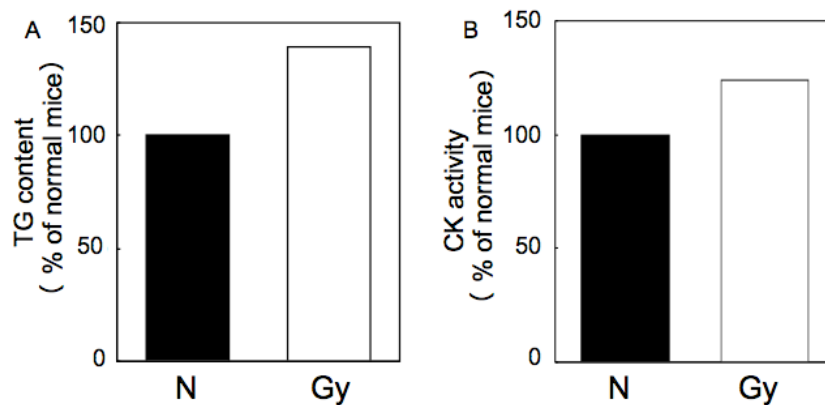
これらの結果は、スペルミンのない Gy マウス肝臓湿重量中の NEFA 量は、Normal マウスと比較して減少していることを示すものと考えられた。

これらの結果を考え合わせると、Gy マウス肝臓中では Spm 減少により脂質の生合成が抑制されていることが考えられた。さらに、HepG2 細胞への APCHA 添加実験においても、SpmSyn の阻害により脂質蓄積を抑制していることから、肝臓中の脂質代謝に SpmSyn の関与が推察された。

## 第二節 Gy マウス筋肉組織中脂質量の解析

4 週齢の Normal マウスおよび Gy マウス大腿部骨格筋中総脂質を Folch 法により抽出し、総脂質中の TG 量を測定した。Gy マウスの筋肉組織中 TG 量は、Normal マウスと比べて約 40% 増加傾向にあった (Fig. 21)。この結果は、C2C12 細胞への APCHA 添加結果とは異なるが、生体内において骨格筋の脂質蓄積は、過剰なエネルギー状態などにより引き起こされ、C2C12 細胞実験では GlcN による脂質蓄積誘導であるためか、もしくは Gy マウス筋肉組織内に存在する前駆脂肪細胞の分化も関与しているのではないかと推察された。

3 週齢の Normal マウス及び Gy マウスの筋肉組織中の CK 活性を比較したところ、Gy マウスの CK 活性は、Normal マウスに比べ約 20% 増加することがわかった (Fig. 21)。この結果は、C2C12 細胞の筋管細胞への分化過程における APCHA 添加実験結果と一致するものと考えられた。また Normal マウスと Gy マウスにおける筋組織中の CK を介したエネルギー代謝は Normal マウスと比較し、高い傾向にあることが示唆された。



**Fig. 21 TG contents and CK activity in muscle of Gy and Normal mice.**  
(A) TG contents (B) CK activity

## 小括および考察

Gy マウスの組織中脂質量についてはこれまで報告がなく、白色脂肪組織が観察されないだけでなく、肝臓中においては Normal マウスと比べて、Cho 量の割合に差はなく、TG および NEFA 量が減少していることが初めて明らかになった。これらの結果は、Gy マウス肝臓中では SpmSyn 遺伝子欠損あるいはそれによる Spm 減少により、脂質の生成が抑制されていることを示唆するものと考えられた。また、肝臓細胞である HepG2 細胞への APCA 添加においても SpmSyn の阻害により脂質蓄積を抑制したことから、肝臓中の脂質代謝に SpmSyn が関与することが示唆された。

一方で、骨格筋中の TG 量は Normal マウスと比較して高い傾向にあり、CK 活性も Gy マウスでは増加する傾向にあった。CK は筋組織内でのエネルギー生成において重要な役割を有する酵素であり、一般に  $\text{Cr} + \text{MgATP}^{2-} \rightarrow \text{PCr}^{2-} + \text{MgADP}^{+} + \text{H}^{+}$  の反応を触媒することで ATP 生成に関与している。筋芽細胞では、筋管細胞への分化過程において CK 活性が上昇するが、マウス個体においても成長にともない、筋組織中の CK 活性が増加することが報告されている [39]。このことから、Gy マウス骨格筋中では、CK を介したエネルギー代謝は Normal マウスと比較して高い傾向にあることが示唆された。TG 量の増加は、分化過程にある 3T3-L1 細胞への APCA 添加により成熟脂肪細胞への分化が促進された結果から、骨格筋中の脂肪前駆細胞分化が促進されているのではないかと推測されるが、より詳細な検討が必要である。

肝臓および骨格筋中の脂質量を測定したことにより、Gy マウスではエネルギー代

謝の亢進が予想された。Gy マウスの表現型の一つに旋回運動 [8] があり、脳機能不全にくわえ、運動量やエネルギー消費量の亢進も考えられ、今後それらの条件も考慮した詳細な検討を行なうことにより、SpmSyn と脂質代謝の生体内に置ける関係性が明らかになると考えられる。

## 総括

本研究では、脂質代謝におけるポリアミンの機能を解明することを目的として、脂肪細胞である 3T3-L1 細胞、肝臓細胞である HepG2 細胞そして骨格筋細胞である C2C12 細胞の分化および脂質蓄積について、細胞内ポリアミン量の変動による影響を調べた。ポリアミン合成酵素阻害剤 MCHA と APCHA を用いることで、総ポリアミン量を変化させることなく、細胞内 Spd と Spm をそれぞれ減少させることにより、Spd および Spm の脂質蓄積における機能を調べることを計画し、さらにこれまで明らかにされていなかったポリアミン分解経路の関与を検討した。

第一章では、3T3-L1 脂肪前駆細胞の分化過程において Spd/Spm 比の変動及び SSAT 活性の変動が起きることを明らかにした。また MCHA は分化を抑制させ、APCHA は分化を促進させることがわかった。APCHA 添加によって SSAT 活性の著しい上昇がみられた。

APCHA による脂質蓄積増大効果は、PAO および SMO 阻害剤の併用により control と同程度にまで抑えられ、APCHA の作用機序にポリアミン分解酵素の関与が示唆された。また、還元剤の NAC との併用により分化のシグナルとなる酸化物の影響を阻害した結果、APCHA の効果が抑制され、ポリアミン代謝により生成される過酸化水素やアクロレインがシグナルとして作用する可能性が示唆された。しかし NAC は脂肪細胞の分化を完全に抑制するが、APCHA との併用では脂肪滴が確認でき、control と同程度まで TG を蓄積したことから、NAC により阻害されない経路の存在も示唆された。

第二章では、成熟脂肪細胞の脂質蓄積について、細胞内ポリアミン量の変化が及ぼす影響を調べた結果、分化過程とは異なり、MCHA により脂質蓄積が増加し、APCHA により脂質蓄積が減少することを見出した。分化過程と同様に、APCHA は SSAT 活性の上昇を伴って脂質蓄積を変化させた。SSAT と脂質代謝の関係を探るため、BENSpm 添加による脂肪細胞分化および脂質蓄積への影響を検討したところ、BENSpm は分化を完全に抑制し、成熟後の脂質蓄積も抑制することがわかり、APCHA とは異なる結果から、APCHA による作用は、SSAT によるものだけでなく、SpmSyn 活性阻害やそれによる Spm 量減少などが関わっていることが示唆され、脂質蓄積における新たな Spm の機能を示している可能性が推測された。

第三章では、肝臓細胞である HepG2 細胞および骨格筋細胞である C2C12 細胞中の脂質蓄積におけるポリアミンの関連性を調べた。HepG2 細胞への脂質蓄積過程では Spd と Spm 量がどちらも増加し、SpdSyn と SpmSyn 活性がともに増加することがわかった。また、APCHA 添加により脂質蓄積量が減少することが明らかとなり、HepG2 細胞への脂質蓄積に Spm 量の変化あるいは SpmSyn 活性の関与が示唆された。さらに APCHA の効果は Spm 量の減少より前にも起こることがわかり、APCHA そのものにも脂質代謝を変化させる作用が存在すると考えられた。

C2C12 細胞の筋管細胞への分化において、Spd 量の減少、Spm 量の増加が起こり、同様の作用を起こす MCHA の添加時だけでなく、APCHA 添加によっても分化の指標である CK 活性が上昇することがわかり、C2C12 細胞の分化にポリアミン量の調節が重要であることが示唆された。また、C2C12 細胞に GlcN による脂質蓄積を誘導した条件では、Spm 量が増加した。さらにポリアミンの添加により脂質蓄積が増強し、その作用は Spd に強く現れることを見出した。さらに、APCHA 添加により脂質蓄積が抑制されることがわかり、APCHA には脂肪細胞、肝臓細胞、骨格筋細胞に共通して、過剰な脂質の蓄積を抑制する作用があるものと考えられた。

第四章では、Gy マウス肝臓組織および骨格筋中の脂質量を比較することで、マウス個体における SpmSyn 活性および Spm 量の脂質蓄積に及ぼす作用を検討した。肝臓中では、Normal マウスと比較して TG 量、NEFA 量の減少がみられ、脂質の生成が抑制されている可能性を見出した。HepG2 細胞への APCHA 添加においても脂質蓄積が抑制されており、肝臓中の脂質代謝に SpmSyn 活性あるいは Spm 量が関与していると考えられた。

一方、Gy マウスの骨格筋中では、TG 量および CK 活性どちらも増加する傾向にあった。CK 活性は分化時に上昇するだけでなく、生体においては成長とともに増加することから、Gy マウス骨格筋中では、CK を介したエネルギー代謝は Normal マウスと比較して高い傾向にあることが示唆された。TG 量の増加は、分化過程にある 3T3-L1 細胞への APCHA 添加により成熟脂肪細胞への分化が促進された結果から、骨格筋中の脂肪前駆細胞分化が促進されているのではないかと推測している。Gy マウスにおける脂質代謝の検討には、運動量、エネルギー消費量などその他の因子も関わることから、今後より正確に条件を揃えた詳細な検討が必要である。

Gy マウス組織中の脂質量測定と、APCHA を用いた培養細胞実験とで一致する結果が得られたことから、3 章までにおいて確立した培養細胞による実験系が、SpmSyn 活性および Spm 量の変化による脂質蓄積への影響を調べる上で今後役立つだけでなく、Gy マウスに対する細胞実験モデルとなる可能性も期待出来る。また、これまでにポリアミン量変動と GPDH 活性上昇との関連性 [15] や、結腸ガン患者において PPAR- $\gamma$  遺伝子、SSAT 遺伝子及び ODC 遺伝子の発現上昇が報告され [31]、脂質代謝の中心的役割を担う因子との関連性が予想出来る。今回、脂肪細胞においてポリアミン代謝により生成される酸化物がシグナルとしての機能を有することが示唆されたが、今後より詳細な作用機序を明らかにしていくことで、ポリアミンが脂質代謝異常における新たなターゲットとなる可能性を期待している。

本論文で使用した略号を示す。

AdoMetDC ; S-adenosylmethionine decarboxylase

AdoMet ; S-adenosylmethionine

AG ; aminoguanidine

APCHA ; N-(3-aminopropyl)cyclohexylamine

BENSp<sup>m</sup> ; N<sup>1</sup>, N<sup>11</sup>-bis(ethyl)norspermine

BSA ; bovine serum albumin

CS ; newborn calf serum

deAdoMet ; decarboxylated S-adenosylmethionine

DEX ; dexamethasone

DFMO ;  $\alpha$ -difluoromethylornithine

DMEM ; dulbecco's modified eagle's medium

DTT ; dithiothreitol

FBS ; fetal bovine serum

FFA ; free fatty acids

GlcN ; glucosamine

GPDH ; glycerol-3- phosphate dehydrogenase

HS ; hors serum

HPLC ; high performance liquid chromatography

IBMX ; isobutylmethylxanthine

INS ; insulin

MCHA ; *trans*-4-methylcyclohexylamine

MGBG ; methylglyoxal bis(guanylhydrazone)

MTA ; 5'-methylthioadenosine

ODC ; ornithine decarboxylase

OPA ; o-phthalaldehyde

PAO ; polyamine oxidase

PBS ; phosphate buffered saline

Put ; putrescine



SMO ; spermine oxidase

Spd ; spermidine

SpdSyn ; spermidine synthase

Spm ; spermine

SpmSyn ; spermine synthase

SSAT ; spermidine / spermine-*N*<sup>1</sup> acetyltransferase

TCA ; trichloroacetic acid

TG ; triglyceride

TNF- $\alpha$  ; tumor necrosis factor- $\alpha$

## 実験の部

### 試薬・材料

MCHA、APCHA、MDL72527、BENSpm、N<sup>1</sup>-dansylnorspermine、N<sup>1</sup>-acetyl-N<sup>12</sup>-dansylnorspermine は当研究室で合成したものをを用いた。PBS はタカラバイオ 株式会社から、アセチル CoA は SIGMA 社、HPLC 溶媒およびその 他 の 試 薬 は 和 光 純 薬 及 び 関 東 化 学 から それ ぞ れ 購 入 し た。分 化 誘 導 剤 に 用 い た IBMX、INS、DEX は 和 光 純 薬 から 購 入 し た。DMEM およ び 培 養 実 験 に 用 い た 他 の 生 化 学 試 薬 は 全 て Gibco 社 から 購 入 し た。水 溶 液 は す べ て milliQ 水 を 用 い た。C2C12 細 胞 は 理 化 学 研 究 所 バイ オ ソース センター セル バン ク から 購 入 し た も の を 用 い た。

### 実験動物

Gy マウス は ペンシルバニア 州 立 大 学 Dr. A. E. Pegg より 頂 き、城 西 大 学 全 学 動 物 実 験 管 理 委 員 会 の 承 認 を 得 て、城 西 大 学 動 物 実 験 規 程 に 従 い、実 験 に 用 い た。

### 細胞培養

#### 1. 3T3-L1 細胞

10% CS を 含 む DMEM (炭 酸 水 素 ナ ト リ ウ ム 3.7 mg/mL + ペ ニ シ リ ン 50 unit/mL + ス ト レ プ ト マ イ シ ン を 添 加) 中 で 培 養 し、継 代 し た。培 地 は 2 日 ご と に 交 換 し た。分 化 誘 導 培 地 に は、10% FBS を 含 む DMEM を 用 い た。細 胞 を  $0.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> と な る よ う に 播 種 し、3 日 間 の 前 培 養 期 間 を 置 い て コ ン フ ル エ ン ト と な っ た 細 胞 (0 日 目) に 次 の よ う に 分 化 誘 導 を 行 っ た。ま ず、0.5 mM IBMX と 1  $\mu$ M DEX を 加 え た 培 地 で 培 養 し、2 日 後 (2 日 目)、10  $\mu$ g/mL INS を 加 え た 培 地 に 交 換 し た。そ の 2 日 後 (4 日 目) 10% FBS 含 有 DMEM に 戻 し、以 降 2 日 ご と に 培 地 交 換 を 行 っ た。分 化 を 誘 導 し な い 細 胞 は、0 日 目 から 4 日 目 ま で の 間 10% FBS 含 有 DMEM 中 で 培 養 し た。

## 2. HepG2 細胞

10% FBS を含む DMEM (炭酸水素ナトリウム 3.7 mg/mL、ペニシリン 50 unit/mL 及びストレプトマイシン 50 unit/mL を含む) 中で培養した。細胞を  $1.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> となるように播種し、3 日間の前培養期間を置いてコンフルエントとなった細胞へ脂質蓄積を誘導した。はじめに 5% BSA を含む DMEM に培地交換した (-1 日目)。その翌日 (0 日目)、1 mM オレイン酸を含む 5% BSA 培地に交換した。この培地交換は、24 時間ごとに行い、3 日目まで培養を行った。

## 3. C2C12 細胞

10% FBS を含む DMEM (炭酸水素ナトリウム 3.7 mg/mL、ペニシリン 50 unit/mL、及びストレプトマイシン 50 unit/mL を添加) 中で培養した。増殖培地を用い、細胞を  $0.16 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> となるように播種した。3 日間の前培養期間を経てサブコンフルエントとなった細胞 (0 日目) を用いた。

筋管細胞への分化誘導は、0 日目の細胞の培地を、分化培地として 5 % HS を含む DMEM に交換し、以後、培地交換を 24 時間ごとに行った。

脂質蓄積誘導は、0 日目に脂質蓄積誘導培地として 2% HS を含む DMEM 中に GlcN を添加した培地に交換した。以後、GlcN を含む分化誘導培地を用いて 24 時間ごとに培地交換を行った。

### Oil Red O 染色

0.15 g の Oil Red O を 50mL のイソプロピルアルコールに溶かし、Oil Red O 保存液を調製した。染色には、Oil Red O 保存液:水=3: 2 に調製し、10 分間静置した後、0.45  $\mu$ m フィルターでろ過したものを染色に用いた。

細胞は、ディッシュから培地を除去した後、4% ホルマリンを含む PBS 水溶液を加えて室温に 30 分間静置し、固定した。固定後 PBS により 2 回洗浄し、Oil Red O 染色液をディッシュに添加し、室温にて染色した。その後 PBS で 2 回洗浄し、顕微

鏡により観察した。染色時間は 3T3-L1 細胞は 5 分、HepG2 細胞は 60 °C に加温しながら 10 分間、C2C12 細胞は 30 分間とした。

#### Mayer's Hematoxylin - Oil Red O 共染色

Mayer's Hematoxylin 溶液を 0.45  $\mu$ m フィルターによりろ過したものを染色に用いた。Oil Red O 染色には前述の通りに調製した Oil Red O 染色液を用いた。ディッシュから培地を除去した後、細胞に 4 % ホルマリン水溶液を添加し、室温にて 30 分間静置し、固定した。水洗浄の後、Mayer's Hematoxylin 染色液を添加し、室温にて 3 分間染色した。その後水洗浄し、Oil Red O 染色液をディッシュに添加し、室温にて 30 分間染色した。

#### ポリアミン量測定

ディッシュから培地を除去した後、PBS 1 mL で細胞を 2 回洗浄した。その後、10% TCA をディッシュに添加し、セルスクレイパーを用いて細胞をはがした。その細胞の懸濁液を 13,000  $\times$  g、20 分間の遠心分離の操作後、上清を 1.5 ml のサンプルチューブに移し、HPLC 測定用試料とした。ペレットは 0.1 M 水酸化ナトリウム 200  $\mu$ L に溶解し、その溶液中に存在するタンパク量を Bradford 法にて定量した。

ポリアミン量の測定には、陽イオン交換 HPLC を用い、ポストカラムラベル OPA 法による蛍光を測定した。移動相として 12.5% メタノール含有クエン酸緩衝液 (5N NaOH で pH 5.5 に合わせたもの) を用いた。ポンプの流速はクエン酸緩衝液 0.3 mL/min、OPA は 0.2 mL/min にてそれぞれ送液し、蛍光検出には励起波長 345 nm、蛍光波長 445 nm を用い、カラム温度 70 °C とした。移動相ポンプ及び発色試薬ポンプは LC-6A と LC-7A (株式会社島津製作所) を用いた。蛍光検出器は RF530 (株式会社島津製作所) を用いた。カラム樹脂は MCI GEL CK10S (三菱化学株式会社) を用いた。カラムオーブンは IC-150MA (アズワン株式会社) を用いた。オートサンプラーは 851-AS (日本分光株式会社) を用いた。

APCHA、MCHA、MDL72527 添加細胞試料中のポリアミン量の測定には、移動相として7% メタノール含有クエン酸緩衝液を用いるOPA ポストカラム HPLC 法を用いた。測定条件は上記と同様に行った。

### SSAT 活性測定 [32]

ディッシュから培地を除去した後 PBS 1 mL で 2 回洗浄した。SSAT homogenate buffer (1 mM EDTA、10 mM Tris HCl、4°C、pH 7、2.5 mM DTT)を添加し、セルスクレイパーを用いて細胞をはがした。その細胞を超音波破碎機を用いて 10 秒間氷冷下超音波破碎した。試料を 4 °C、13,000 x g、20 分間超遠心し、その上清を酵素溶液とした。

反応は、40  $\mu$ M N<sup>1</sup>- dansyl norspermine、50 M acetyl-CoA 及び酵素溶液 200  $\mu$ L (タンパク量として 50  $\mu$ g) について、37 °C で 10 分間酵素反応を行った。反応後、100% TCA 23  $\mu$ L を加えて除タンパクし、13,000 x g、20 分間遠心後、その上清 100 L について HPLC を用いて測定した。

移動相として、TFA 0.1%・オクタンスルホン酸ナトリウム 25 mM・MeOH (v/v) 73 % 溶液を用いた。測定条件として、分析カラム:TSKgel ODS 80Ts (TOSOH)  $\phi$  4.6 mm  $\times$  150 mm、流速:0.5 mL/min、励起波長 333 nm、蛍光波長 544 nm カラム温度:45 °C とした。

### SpdSyn 及び SpmSyn 活性測定

ディッシュから培地を除去した後、PBS 1 mL により 2 回洗浄し、PBS 100  $\mu$ L を添加し、セルスクレイパーを用いて細胞を回収した。その細胞を超音波破碎機を用いて 10 秒間氷冷下超音波破碎した。試料を 4 °C、10,000  $\times$  g、20 分間遠心分離し、その上清を酵素溶液とした。SpdSyn 酵素反応時には、1 mM プトレシン (Put) 及び SpmSyn 阻害剤である 0.5 mM APCHA、SpmSyn 酵素反応時には、5 mM Spd 及び SpdSyn 阻害剤である 0.5 mM MCHA 存在下、0.1 mM AdoMet、0.6 mM アデニン、酵素試料を含む 0.1 M リン酸緩衝液中 (pH 7.5)、37 °C 1 時間で酵素反応を行った。SpdSyn 活性測定には、APCHA との併用により SpmSyn による dcAdoMet からの

MTA の生成を防ぎ、SpmSyn 活性測定には MCHA との併用により SpdSyn を阻害し、SpdSyn による dcAdoMet からの MTA 生成を防ぐ。また、アデニンは生成する MTA 分解酵素阻害剤として添加した。酵素反応より生成した MTA について 1.5 M クロロアセトアルデヒド存在下、70 °C、15 分間誘導体化反応を行い、生成した 1, N<sup>6</sup>-エテノメチルチオアデノシンを逆相 HPLC により定量した。

#### 細胞中およびマウス組織中脂質量測定

Folch 法に従って総脂質の抽出を行った。総脂質中の TG 量、Cho 量及び NEFA 量の測定には、トリグリセライド E-テストワコー、コレステロール E-テストワコー、NEFA C-テストワコー (和光純薬工業 (株)) をそれぞれ用いた。

#### CK 活性測定

培地を除去した後、PBS 2 mL により 2 回洗浄し、PBS 200  $\mu$ L を添加し、セルスクレイパーを用いて細胞を回収した。その細胞を超音波破碎機を用いて 10 秒間氷冷下超音波破碎した。試料を 4 °C、13,000  $\times g$ 、20 分間遠心分離し、その上清を酵素溶液とした。測定は、CPKII-テストワコー (和光純薬工業 (株)) を用いた。

## 引用文献

- [1] 藤田敏郎 監修 生活習慣病と PPARs ライフサイエンス出版
- [2] T. Yamauchi, J. Kamon, H. Waki, K. Murakami, K. Motojima, K. Komeda, T. Ide, N. Kubota, Y. Terauchi, K. Tobe, H. Miki, A. Tsuchida, Y. Akanuma, R. Nagai, S. Kimura, T. Kadowaki, *J. Biol. Chem.*, 276, 41245-41254 (2001).
- [3] S. C. Jamdar, W. F. Cao, E. Samaniego, *Enzyme Protein*, 49 222-230 (1996).
- [4] D. H. Lockwood, L. E. East, *J. Biol. Chem.*, 249, 7717-7722 (1974).
- [5] O. Heby, *Differentiation*, 19, 1-20 (1981).
- [6] A. E. Pegg, P. P. McCann, *Am. J. Physiol.* 243 (Cell Physiol. 12) C212-C221 (1982).
- [7] J. Jell, S. Merali, M. L. Hensen, R. Mazurchuk, J. A. Spornyak, P. Diegelman, D. Kisiel, C. Barrero, K. K. Deeb, L. Alhonen, M. S. Patel, C. W. Porter, *J. Biol. Chem.*, 282, 8404-8413 (2007).
- [8] R. A. Meyer, Jr. C. M. Henley, M. H. Meyer, P. L. Morgan, A. G. McDonald, C. Mills, D. K. Price, *Genomics* 48, 289-295 (1998).
- [9] X. Wang, Y. Ikeguchi, D. E. McCloskey, P. Nelson, A. E. Pegg, *J. Biol. Chem.* 279, 51370-51375 (2004).
- [10] A. L. Cason, Y. Ikeguchi, C. Skinner, T. C. Wood, K. R. Holden, H. A. Lubs, F. Martinez, R. J. Simensen, R. E. Stevenson, A. E. Pegg, C. E. Schwartz, *Eur. J. Hum. Genet.*, 11, 937-944 (2003).
- [11] B. G. Erwin, A. E. Pegg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102, 272-278 (1981).
- [12] B. G. Erwin, D. R. Bethell, A. E. Pegg, *Am. J. Physiol.* 246, C293-300 (1981).
- [13] A. Chawla, M. A. Lazar, *J. Biol. Chem.*, 268, 16265-269 (1993).
- [14] T. Beppu, A. Shirahata, N. Takahashi, H. Hosoda, K. Samejima, *J. Biochem.*, 117, 339-345 (1995).
- [15] C. Carpené, D. Daviaud, J. Boucher, S. Bour, V. Visentin, S. Grès, C. Duffant, E. Fontana, X. Testar, JS. Saulnier-Blache, P. Valet, *Metabolism*, 55, 1397-1405 (2006).

- [16] E.Z. Amri, R. Barbaras, A. Doglio, C. Dani, P. Grimaldi, G. Ailhaud, *Biochem. J.*, 239, 363-370 (1986).
- [17] R. M. Faruqi, E. J. Poptic, T. Ruhe Faruqi, C. DelaMotte, P. E. DiCorleto, *Am. J. Physiol.*, 273, H817-H826 (1997).
- [18] A. Pledge, Y. Huang, A. Hacker, Z. Zhang, P. M. Woster, N. E. Davidson, R. A. Casero Jr., *J. Biol. Chem.* 280, 39843-39851 (2005).
- [19] M. Cervellia, E. Fratinia, R. Amendolab, M. Bianchia, E. Signoric, E. Ferrarod, A. Lisic, R. Federicoa, L. Marcoccie, P. Mariottinia, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 41, 934-944 (2009).
- [20] T. Fujita, S. Furukawa, K. Morita, T. Ishihara, M. Shiotani, Y. Matsushita, M. Matsuda, I. Shimomura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 328, 369-374 (2005).
- [21] 秋山 徹 編 細胞・培地活用ハンドブック 羊土社
- [22] M. J. G. Lechón, M. T. Donato, A. M. Romero, N. Jiménez, J. V. Castell, J. E. O'Connor. *Chem. Biol. Interact.*, 165, 106-116 (2007).
- [23] Y. Hozumi, M. Kawano, V. C. Jordan, *Euro. J. Endo.*, 143, 427-430 (2000).
- [24] K. H. Lee, J.Y. Park, K. Kim, *FEBS Lett.*, 578, 47-52 (2004).
- [25] D. I. Phillips, S. Caddy, V. Llic, B. A. Fielding, K. N. Frayn, A.C. Borthwick, R. Taylor, *Metabolism*, 45, 947-950 (1996).
- [26] D. A. Pan, S. Lillioja, A. D. Keiketos, M. R. Milner, L. A. Baur, C. Bogardus, A. B. Jenkins, *Diabetes*, 46, 983-988 (1997).
- [27] H. Y. Jarvinen, M. C. Daniels, A. Virkamäki, S. Mäkimattila, R.A. DeFronzo, D. McClain, *Diabetes*, 45, 302-307 (1996).
- [28] K. A. Robinson, M. L. Weinstein, G. E. Lindenmayer, M.G. Busee, *Diabetes*, 44, 1438-1446 (1995).
- [29] D. A. McClain, *J. Diabetes Complications*, 16, 72-80 (2002).
- [30] T. Fujita, S. Furukawa, K. Morita, T. Ishihara, M. Shiotani, M. Matsuda, I. Shimomura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 328, 369-374 (2005).
- [31] M. Linsalata, R. Giannini, M. Notarnicola, A. Cavallini, *BMC Cancer*, 191,



19-26 (2006).

- [32] K. Takao, S. Miyatake, K. Fukazawa, M. Wada, Y. Sugita, A. Shirahata, *Anal. Biochem.*, 376, 277-279 (2008).

## 謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻、御助言並びに本論文の御校閲を賜りました、新津 勝 教授に心より感謝致します。

本論文の作成に際し、御教示と御校閲を賜りました、薬剤学講座 従二和彦 教授、病態解析学講座 小林 順 教授に深く感謝致します。

3T3-L1 脂肪前駆細胞を御供与頂き、さらに御助言頂きました 食品機能学講座 真野 博 教授に心より感謝致します。

本研究に際し、御指導と御協力を頂きました、機能性食品科学講座 和田政裕教授、ペンシルバニア州立大医 Anthony E. Pegg 名誉教授に厚く感謝致します

本研究に際し、終始様々な御指導、有益な御助言を頂きました、白幡 晶 教授、杉田義昭 准教授、池口文彦 准教授、高尾浩一 助教、山崎健一 助手に心より感謝致します。

本実験に際し、終始ご協力いただきました伊藤俊行 博士、坂口花織 氏、岩城孝宏 氏、上杉粹世 氏、片倉美佳 氏に感謝致します。

最後に、終始御協力頂いた、生体分析化学研究室、旧生化学研究室、細胞生理化学研究室内の皆様に感謝致します。